

Markierung kohleadsorbierter Verbindungen mit Tritium  
nach dem Wilzbach-Verfahren.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans Wollenberg

aus Landsberg/Warthe

1967

**Druck:**  
**ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT**  
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.  
**DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE**  
1 Berlin 33, Garystr. 45

Markierung kohleadsorbierter Verbindungen mit Tritium  
nach dem Wilzbach-Verfahren.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans Wollenberg

aus Landsberg/Warthe

1967

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. E. Schütte
2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Schenck

Tag der mündlichen Prüfung: 20.6.1967

Tag der Promotion: **13. Juli 1967**



Die vorliegende Arbeit wurde im Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung von Herrn Professor Dr. Dr. Ernst Schütte durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Dr. Schütte bin ich für die großzügige Förderung und das rege Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Martin Wenzel möchte ich für seine Anregungen und die stets freundliche Bereitschaft zur Diskussion aller Probleme, die sich bei der Durchführung der Arbeit ergaben, danken.



# Markierung kohleadsorbierter Verbindungen mit Tritium nach dem Wilzbach-Verfahren.

## Inhaltsübersicht:

|                                                                                              | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. Einleitung und Problemstellung                                                            | 2     |
| B. Allgemeines, physikalische Eigenschaften des Tritiums, Nachweis- und Markierungsverfahren | 5     |
| C. M e t h o d i k                                                                           |       |
| 1. Entwurf und Aufbau einer Tritierungs-<br>apparatur                                        | 8     |
| 2. Markierungsversuche                                                                       | 11    |
| 3. Aufarbeitung und Messung der markierten<br>Präparate                                      | 21    |
| 4. Anwendungsbeispiel einer markierten<br>Substanz                                           | 32    |
| D. E r g e b n i s s e                                                                       |       |
| 1. Erfahrungen mit der Markierungsapparatur                                                  | 34    |
| 2. Ergebnisse der Aktivitätsmessungen                                                        | 34    |
| 3. Verunreinigung mit radioaktiven Neben-<br>produkten                                       | 40    |
| 4. Tritiumverteilung beim Rutin                                                              | 41    |
| E. D i s k u s s i o n                                                                       |       |
| 1. Markierung von Substanzen mit vergrößerter<br>Oberfläche                                  | 43    |
| 2. Markierung bei tiefen Temperaturen                                                        | 46    |
| 3. Verunreinigung durch radioaktive Neben-<br>produkte                                       | 47    |
| F. Zusammenfassung                                                                           | 50    |
| A n h a n g :                                                                                |       |
| G. Bedienungshinweise und Arbeitsvorschriften                                                | I     |
| H. Literaturverzeichnis                                                                      | IX    |

## A ) Einleitung und Problemstellung:

Beschäftigt man sich mit der Beobachtung physiologisch-chemischer Vorgänge, den chemischen Veränderungen von Arzneimitteln im Organismus oder mit dem Nachweis von Naturstoffen und Zusatzstoffen im Rahmen der Lebensmittelchemie, so stößt man oft auf Probleme, deren Lösung durch Einsatz markierter Moleküle erleichtert oder überhaupt erst ermöglicht wird.

Zur Markierung organischer Verbindungen, die im wesentlichen aus den Elementen Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff aufgebaut sind, eignen sich als radioaktive Leitisotope nur Kohlenstoff-14 und Tritium.

Kohlenstoff-14 hat als Bestandteil markierter Verbindungen schon lange einen festen Platz bei biochemischen Untersuchungen. Für Tritium traf das bisher nicht im gleichen Maße zu. Diese Tatsache erscheint erstaunlich, wenn man bedenkt, daß Tritium schon seit Jahren in großen Aktivitäten trägerfrei und preisgünstig im Handel ist. Der Preis des Tritiums liegt etwa 100 bis 1000 mal unter dem entsprechenden Kohlenstoff-14-Aktivitäten. Über diesen Vorteil hinaus zeichnet sich Tritium neben seiner relativ geringen Radiotoxizität durch einfache und vielseitige Markierungsmöglichkeiten aus. Insbesondere lassen sich durch die Methoden der Direktmarkierung auch nichtsynthetisierbare Naturstoffe mit kompliziertestem Aufbau markieren.

Bei Versuchen an lebenden Organismen mit derartig markierten Substanzen tritt fast immer eine starke Verdünnung der eingesetzten radioaktiven Verbindung durch endogene Produkte ein. Das gleiche ist auch bei analytischen Problemen der Lebensmittelüberwachung zu erwarten, bei denen quantitative Bestimmungen z.B. von Vitaminen, Konservierungsstoffen oder Schädlingsbekämpfungsmitteln nach der Isotopenverdünnungsmethode ausgeführt werden.

Nur bei ausreichend hoher spezifischer Aktivität der Ausgangsverbindung sind dann noch befriedigende Aktivitätsmessungen und damit genaue Resultate zu erwarten.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung tritiummarkierter Verbindungen nach dem von K.E. Wilzbach 1957<sup>1)</sup> beschriebenen Gasaustauschverfahren.

Bei diesem Verfahren wird in einem zuvor evakuierten Reaktionsgefäß Tritiumgas mit der zu markierenden Verbindung inkubiert und dabei im Laufe mehrtägiger Einwirkung der vom Tritium ausgehenden  $\beta$ -Strahlung der Wasserstoff der organischen Substanz gegen den radioaktiven Wasserstoff ausgetauscht.

Die Wilzbach-Methode zeichnet sich vor allen anderen Markierungsmöglichkeiten mit Tritium dadurch aus, daß auch nichtsynthetisierbare Naturstoffe, wie z.B. Proteohormone<sup>2,3)</sup> Nukleinsäuren<sup>4,5)</sup> und andere makromolekulare Verbindungen auf chemisch sehr schonende Weise markiert werden können. Das Verfahren hat wegen seiner verhältnismäßig einfachen Handhabung verbreitete Anwendung gefunden.

Ziel dieser Arbeit war es, die spezifischen Aktivitäten der nach Wilzbach markierten Substanzen zu steigern.

Die bei der Wilzbach-Markierung mit Gamma-Strahlen<sup>6)</sup>, UV-Licht<sup>7,8)</sup> und Mikrowellen<sup>9)</sup> mögliche Aktivitätssteigerung durch Energiezufuhr von außen hat den großen Nachteil, daß gleichzeitig die unerwünschten Nebenprodukte infolge vermehrter Zersetzung der zu markierenden Verbindung oft beträchtlich anwachsen. Diese Nebenprodukte können inaktiv oder ebenfalls mit Tritium markiert sein. Besonders letztere verunreinigen schon in unwägbaren Mengen das markierte Präparat durch beachtliche Aktivitäten. Sie müssen beim Aufarbeiten der tritierten Substanzen sorgfältig abgetrennt werden.

Die dazu erforderlichen Reinigungsoperationen sind jedoch namentlich bei vielen empfindlichen Naturstoffen schwierig oder überhaupt nicht ausführbar. Gerade solche Verbindungen interessieren den Biochemiker aber oft besonders.

Um die Schwierigkeiten einer umfangreicheren Reinigung zu umgehen, sollte das Wilzbach-Verfahren im Rahmen dieser Arbeit so abgewandelt werden, daß auch ohne zusätzliche Energie von außen zuzuführen, bei der Tritium-Markierung höhere spezifische Aktivitäten erhalten werden konnten. Möglichkeiten dazu ergaben sich auf Grund folgender Überlegungen:

Wegen der geringen Eindringtiefe der schwachen  $\beta$ -Strahlung des Tritiums bei flüssigen und festen Substanzen (maximal 6  $\mu$  bei Stoffen der Dichte 1) können Markierungsreaktionen nur in dünnen Oberflächenschichten ausgelöst werden. Das von

der weichen  $\beta$ -Strahlung nicht erreichbare Innere der Substanzen geht dadurch der Markierung mit Tritium verloren.

Es müssen sich demnach höhere Markierungsraten erzielen lassen, wenn die mit dem radioaktiven Wasserstoff in Berührung gebrachte Substanz in so dünner Schicht ausgebreitet wird, daß die markierungsvermittelnde Strahlung optimal ausgenutzt werden kann.

Ein Ausbreiten fester Substanzen unter Vergrößerung der Oberfläche wird schon erreicht, wenn man kristalline Verbindungen zu kleineren Teilchen zerreibt<sup>10)</sup> oder in dünner Schicht auf die innere Wandung des Reaktionsgefäßes verteilt<sup>11)</sup>. Extrem dünne Schichten mit stark vergrößerter Oberfläche entstehen, wenn Substanzen aus Lösungen von porösen Adsorptionsmitteln aufgenommen werden. Hierzu eignet sich besonders aktive Kohle. Je nach Lösungsdruck der zu adsorbierenden Substanzen kommt es zu einer ein- bis mehrmolekularen Bedeckung der wirksamen inneren Oberfläche der Kohle. Letztere kann 100 bis 1000 m<sup>2</sup> pro Gramm Kohle betragen<sup>12)</sup>.

In dieser Arbeit werden die Möglichkeiten einer Steigerung der Markierungsraten bei Behandlung kohleadsorbierter Verbindungen mit Tritiumgas nach Wilzbach untersucht. Tritium selbst wird bei Zimmertemperatur von der Kohle nicht adsorbiert und kann frei diffundieren. Erst bei Temperaturen um -200°C kommt es zu einer zusätzlichen Kohleadsorption des radioaktiven Wasserstoffs<sup>13,14)</sup>. Als Ergebnis des höheren Tritiumangebotes innerhalb der Kohle auf die gleichzeitig adsorbierte Substanz ist mit einer weiteren Steigerung der spezifischen Aktivitäten bei der Markierung zu rechnen. Um auch die auf diese Weise erzielbaren Aktivitätserhöhungen zu untersuchen, wurden Markierungsversuche bei tiefen Temperaturen vorgesehen.

Nach Angaben in der Literatur waren bei Bestrahlung adsorbierter Stoffe verminderte Substanzschädigungen festgestellt worden<sup>15)</sup>. Inwieweit eine solche z.B. an Enzymlösungen beobachtete Strahlenschutzwirkung<sup>16)</sup> infolge Adsorption bei der Wilzbach-Markierung geringere Verunreinigungsraten zur Folge hat, sollte ebenfalls überprüft werden.

Die vorzunehmenden Arbeiten gliederten sich in folgende Teilabschnitte:

1. Aufbau einer absolut betriebssicheren Tritierungsapparatur.

2. Markierung kohleadsorbierter Substanzen mit Tritium bei Zimmertemperatur und unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff.
3. Aufarbeitung und Messung der markierten Proben.
4. Anwendungsbeispiele dieser Substanzen.

## B ) Allgemeines:

Physikalische Eigenschaften des Tritiums:

|                                  |                                          |                          |
|----------------------------------|------------------------------------------|--------------------------|
| Herstellungsprozeß               | ${}^6\text{Li} (n, \alpha) {}^3\text{H}$ |                          |
| Halbwertszeit                    | 12,26 Jahre                              |                          |
| Zerfallsart                      | $\beta^-$                                |                          |
|                                  | maximal                                  | Mittelwert               |
| $\beta$ -Energie                 | 18,5 keV                                 | 5,7 keV                  |
| Reichweite der $\beta$ -Teilchen | 0,6 mg/cm <sup>2</sup>                   | 0,039 mg/cm <sup>2</sup> |
| Reichweite in Luft               | 5,6 mm                                   | 0,32 mm                  |
| Reichweite in Wasser und Gewebe  | 6 $\mu$                                  | 0,4 $\mu$                |

Um Tritium über seine äußerst energiearme Strahlung nachweisen und quantitativ bestimmen zu können, sind Strahlendetektoren, deren wirksames Zählvolumen gegenüber dem radioaktiven Präparat durch ein Zählrohrfenster abgeschlossen ist - wie z.B. bei Geiger-Müller Zählrohren - nicht geeignet. Die schwache  $\beta$ -Strahlung des Tritiums vermag auch die dünnsten, bei solchen Zählrohren noch anwendbaren Fenstermembranen nicht zu durchdringen.

Bewährt haben sich dagegen folgende Methoden:

- a) Bei Messungen in der Gasphase ist Tritium Bestandteil des Zählgases und kann in besonderen Gas-Proportionalzählrohren<sup>17,18)</sup> und Ionisationskammern<sup>19,20)</sup> gemessen werden.
- b) In gemeinsamen Lösungen von tritiummarkierten Verbindungen und geeigneten Szintillatorsubstanzen lassen sich die Aktivitäten mit Flüssig-Szintillations-Spektrometern ermitteln.<sup>11,21-27)</sup>

Nachteilig und erschwerend ist bei dem ersten Verfahren die Aufarbeitung der tritiummarkierten Substanzen im Bombenrohr zu einem Zählgas<sup>28-30)</sup>. Dieser Aufwand fällt insbesondere ins Gewicht, wenn eine große Zahl von Einzelmessungen ausgeführt werden muß.

Die allgemeine Verbreitung der Flüssig-Szintillations-Zähler wird durch den sehr kostspieligen Geräteaufwand gehemmt.

Außerdem ist die Meßausbeute sehr stark von der Art des Probenmaterials abhängig.

c) Eine direkte Messung tritiummarkierter Verbindungen mit fensterlosen Methandurchflußzählern ist ebenfalls möglich<sup>31)</sup>. Den relativ einfach auszuführenden Messungen und dem geringeren Aufwand an Meßgeräten steht hier eine verminderte Empfindlichkeit des Nachweises gegenüber. Dieser Nachteil kann durch Verwendung markierter Verbindungen mit möglichst hoher spezifischer Aktivität aufgehoben werden.

Von besonderer Bedeutung ist außerdem die Möglichkeit, auf Papier- oder Dünnschichtchromatogrammen<sup>32,33)</sup> getrennte tritiumhaltige Verbindungen direkt und kontinuierlich zu erfassen. Chromatographische Trennungen sind heute gerade bei biochemischen Arbeiten viel verwendete und unentbehrliche Hilfsmittel.

#### Markierungsverfahren:

Zur Markierung organischer Verbindungen mit Tritium stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Grundsätzlich läßt sich Tritium über chemische Synthesen oder durch Austauschverfahren in das Molekül einbauen.

Der Vorteil einer Tritierung durch klassische chemische Reaktionen - wie z.B. Reduktionen - liegt im Einbau des Leit-isotops an definierter Stelle. Darüberhinaus gelingt es in der Regel, die Reaktionsprodukte auf einfache Weise zu reinigen<sup>34 - 41)</sup>.

Ziel der Austauschverfahren<sup>42-45)</sup> ist es, nicht nur den labilen als Proton abspaltbaren und daher leicht auswaschbaren Wasserstoff organischer Verbindungen durch Tritium zu ersetzen, sondern auch den "stabil" gebundenen Wasserstoff. Neben den mit Katalysatoren arbeitenden Verfahren<sup>46-57)</sup> hat sich hierbei die Direktmarkierung<sup>7)</sup> über die reaktionsvermittelnde  $\beta$ -Strahlung des Tritiums bewährt. Insbesondere lassen sich auch komplizierteste Naturstoffe von biochemischen Interesse, die über Synthesen nicht zugänglich sind, auf diese Weise markieren<sup>3-5,7,10,58-59)</sup>.

#### Markierung nach Wilzbach:

1957 wies K.E. Wilzbach<sup>1)</sup> auf eine Möglichkeit hin, organische Verbindungen mit Tritium direkt zu markieren. Bei dem von ihm beschriebenen Gasaustauschverfahren wird Wasserstoff organischer Verbindungen durch Tritium ersetzt, wenn man die zu markierende Verbindung in einem zuvor evakuieren Reaktions-

gefäß mit gasförmigem radioaktiven Wasserstoff behandelt.

Über den Mechanismus dieser strahlenchemischen Reaktion besteht bisher keine völlige Klarheit. Mit hoher Wahrscheinlichkeit kann jedoch angenommen werden, daß die beim  $\beta$ -Zerfall des Tritiums freiwerdende kinetische Energie der emittierten Elektronen ( $1 \text{ Curie} = 7,6 \times 10^{17} \text{ eV/h}$ ) die beabsichtigte Markierung vermittelt<sup>60)</sup>.

Entsprechend den aufgenommenen Energieanteilen kommt es bei der zu markierenden Substanz und beim unzerfallenen Tritium zu Anregungserscheinungen, Zerfall in Einzelatome und Radikalbildungen. Die Annahme, daß dieser Reaktionsmechanismus durch Energieabsorption ausgelöst wird, kann dadurch gestützt werden, daß es gelingt, durch äußere Anregungsenergie die Markierungsraten zu erhöhen.<sup>7)</sup>

Die Markierung kann über verschiedene Reaktionswege ablaufen. Entweder reagieren die durch Energieabsorption aktivierten Moleküle der organischen Substanz mit nicht-angeregtem Tritium oder umgekehrt aktivierte Tritiumatome bzw. -ionen mit der nicht angeregten organischen Verbindung. Rieß und Wilzbach<sup>60)</sup> halten den ersten Reaktionsablauf für wahrscheinlicher, weil eine bevorzugte Aktivierung der Substanzmoleküle die Nebenreaktionen besser erklärt. Nach Ghanem und Westermarck<sup>7,61)</sup> lassen sich aber höhere Markierungsraten auch erzielen, wenn nur das Tritium durch ein von der Substanz getrenntes Energiefeld aktiviert wird. In diesem Falle dürfte vorwiegend der zweite Reaktionsweg den Markierungsprozeß leiten.

Je nach Reaktionsbedingungen werden einige 100 bis mehrere 1000 Moleküle des zu markierenden Präparates umgesetzt, bevor ein Tritiumatom inkorporiert wird. Neben der erwünschten Markierung mit  $^3\text{H}$  laufen zahlreiche Nebenreaktionen ab. Dabei werden inaktive und radioaktive Nebenprodukte gebildet. Letztere können schon in unwägbaren Mengen das markierte Präparat durch beträchtliche Fremdaktivitäten verunreinigen. Sie müssen beim Aufarbeiten der Probe sorgfältig abgetrennt werden.

Wie sich im übrigen aus dem vermutlichen Reaktionsmechanismus des Markierungsvorganges ergibt, ist ein Einbau des Tritiums an bestimmten Stellen eines Molekül nicht zu erwarten.

## C) Methodik

### 1. Entwurf und Aufbau einer Tritierungsapparatur:

Die bei dem Wilzbach-Verfahren zur Handhabung des gasförmigen Tritiums notwendige Apparatur mußte folgende Anforderungen erfüllen:

- a) Nach vollständigem Evakuieren sollte sie einen dichten Abschluß gegen das Eindringen von Luft gewährleisten und ein Hinausdiffundieren von Tritium verhindern.
- b) Sie sollte das Umpumpen von Gasen (Tritium) von einem Vorratsgefäß in den Probenbehälter und zurück gestatten und dabei Druck- und Volumenmessungen des bewegten Tritiums ermöglichen.
- c) Der Aufbau sollte möglichst einfach und betriebssicher sein, die Bedienung übersichtlich und leicht.

Apparaturen zur Tritiummarkierung organischer Verbindungen nach Wilzbach waren vor Beginn dieser Arbeit schon mehrfach in der Literatur beschrieben worden<sup>4,34,47,62-69</sup>. Wegen ihres meist komplizierten Aufbaues, insbesondere wegen der großen Zahl verwendeter Schliffe und Hähne, entsprachen diese Ausführungen nicht den obigen Grundmerkmalen. Es wurde deshalb eine neue Apparatur konstruiert, die trotz ihres einfachen Aufbaues vielseitige Anwendungen ermöglichte.

### Beschreibung der Apparatur:

Es ist eine immer wieder bestätigte Tatsache, daß man dichte Hochvakuumanlagen nur dann erhält, wenn möglichst wenig bewegliche Teile (Hähne und Schliffe) verwendet werden. Bei der Neukonstruktion einer Tritierungsapparatur wurde konsequent nach diesem Prinzip verfahren.

Die Verwendung eines einzigen durch Quecksilberfüllung dicht verschließbaren Ansatzrohres, das gleichzeitig als Gasbürette und Manometer dient, außerdem die Anschlüsse für eine Hochvakuum- und Töplerpumpe trägt, ist weiterhin als entscheidende Verbesserung gegenüber den bisher bekannten Apparaturen anzusehen.

Im engbegrenzten wegen der Füllung mit Tritium "kritischen" Teil der Apparatur sind je nach Ausführungsart nur noch ein oder zwei Schliffe sowie ein Hochvakuumhahn oder zwei normale Hähne erforderlich. Die Gesamtapparatur erhält

dadurch einen konstruktiv einfachen und übersichtlichen Aufbau.

Die Apparatur in der Ausführung nach Abbildung 1 gestattet nach dem Evakuieren durch Heben und Senken des Quecksilbers zwischen B und C ein Umpumpen des Tritiums aus dem Vorratsgefäß in das jeweilige Reaktionsgefäß und zurück. Außerdem ist es möglich durch Messen des Druckes im Manometerrohr M oder des Volumens in der Gasbürette G eine genaue Dosierung des radioaktiven Wasserstoffs vorzunehmen und zwar bei allen Reaktionen einschließlich Hydrierungen<sup>70)</sup>.

Hahn H ist ein Beutelhahn, dessen massives Küken mit einer rechtwinkligen Durchbohrung versehen wurde.

Seitlich gehen zwei starkwandige Kapillaren ab, mit je einem Schliff NS 5/20 an ihren

Enden. Schliff U hält als Tritiumvorratsgefäß ein Röhrchen mit Uranpulver. Verzichtet man auf eine Bindung des Tritiums an Uran, so kann anstelle dieses Röhrchens unter Fortfall des Schliffes U das gasförmige Tritium auch in einem direkt an das Kapillarrohr angeschmolzenen Gasbehälter aufbewahrt werden.

Der linke Schliff trägt die Probenbehälter (P), die gegebenenfalls mit einem zusätzlichen Hahn ausgestattet, nach dem Füllen mit Tritiumgas während der Markierungszeit von der Gesamtapparatur wieder getrennt werden können. Über den gleichen Schliff wird auch die im Handel bezogene Tritiumampulle (T) angeschlossen, um den radioaktiven Wasserstoff in das Vorratsgefäß zu leiten.

Der offene Beutel des Hochvakuumhahnes setzt sich nach unten in ein U-Rohr fort. Der rechte Schenkel M dieses Rohres

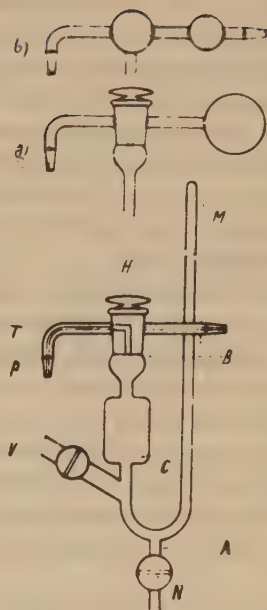


Abbildung 1  
Apparatur zur Markierung organischer Verbindungen mit Tritium

ist mit einer Skala versehen und dient als Manometer, dessen wirksame Länge dem zu erwartenden Tritiumdruck angepaßt werden muß. Der linke Schenkel des U-Rohres erweitert sich einige cm unter dem Beutelende von H zu einer graduierten Gasbürette. Diese wird einmal beim Umpumpen des Tritiums als Gasbehälter, zum anderen bei der Druckmessung als Mc Leodscher Kompressionsraum benötigt.

Dicht unter der Gasbürette geht ein möglichst weitleumiger Schrägansatz ab, der durch einen kräftigen Hochvakuumhahn verschließbar zur Quecksilberdiffusionspumpe und zu einem Vakuummeßgerät führt.

Das im tiefsten Punkt des U-Rohres abzweigende senkrechte Rohr N führt über einen normalen Geradeweghahn zu dem mit einem Vakuumschlauch beweglich angeschlossenen Quecksilberniveaugefäß mit Luftfalle.

Abbildung 1 b zeigt eine weitere bei dieser Arbeit benutzte Variation der Apparatur, die es zusätzlich erlaubt, Tritium vom Uran des Vorratsbehälters in das Reaktionsgefäß und umgekehrt zu überführen, ohne daß dabei der radioaktive Wasserstoff mit dem Quecksilber der Töplerpumpe in Berührung kommt.

Sämtliche Teile der Grundapparatur wurden aus Duranglas 50 gefertigt. Zum Fetten der mit Federn gesicherten Hähne und Schliffe, insbesondere des temperaturbelasteten Schliffes der Uranampulle hat sich Silikon-Hochvakuumfett bewährt.

#### Aufbewahrung des Tritiums:

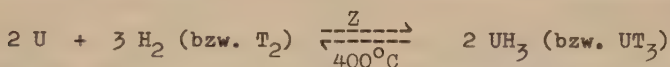
Das zur Markierung benötigte Tritiumgas läßt sich in der Apparatur auf verschiedene Weise speichern:

a) Ohne besonderen Aufwand gestattet die Ausführung der Apparatur nach Abbildung 1a ein Aufbewahren des radioaktiven Wasserstoffs in dem angeschmolzenen kugelförmigen Vorratsgefäß. Dieser Behälter nimmt nach Markierungsreaktionen mit dem zurückgepumpten Tritium aber auch alle anderen gasförmigen Produkte auf, die bei jeder Markierung in unterschiedlichen Anteilen entstehen. Diese Zersetzungsprodukte (Wasserstoff, Methan usw.) verdünnen und verunreinigen das Tritium, so daß es unter Umständen oft schon nach einmaligem Gebrauch nicht mehr verwendet werden kann.

Es wurde deshalb schon aus wirtschaftlichen Gründen nach einer Möglichkeit gesucht, Tritium nach der Markierung nicht nur zu speichern, sondern gleichzeitig auch von den gas-

förmigen Zersetzungsprodukten der Substanz zu befreien, um es mehrmals verwenden zu können.

b) Gute Reinigungsmöglichkeiten ergeben sich, wenn man den radioaktiven Wasserstoff unter Bildung eines metallartigen Hydrides an Uran bindet. Von dieser Verbindung lassen sich alle gasförmigen Nebenprodukte mit Ausnahme von Wasserstoff, der in gleicher Weise gebunden wird wie Tritium, durch Abpumpen entfernen.



Z = Zimmertemperatur

Kompaktes Uran reagiert erst bei  $225^\circ\text{C}$  <sup>71)</sup> mit Wasserstoff bzw. Tritium unter Bildung von  $\text{UH}_3$  bzw.  $\text{UT}_3$ . Ein durch Zersetzen von Uranhydrid aktiviertes Uranpulver nimmt Tritium bereits bei Temperaturen unter  $0^\circ\text{C}$  quantitativ auf und gibt es nach dem Erhitzen auf ca.  $400^\circ\text{C}$  wieder frei <sup>64)</sup>. Herstellung und Anwendung des bei dieser Arbeit verwendeten Uranspeichers werden unter der Zusammenstellung der Arbeitsvorschriften, Teil G 1c auf Seite III beschrieben.

## 2. M a r k i e r u n g s v e r s u c h e .

### Auswahl der Substanzen:

Das Verfahren nach Wilzbach ist grundsätzlich zur Markierung aller organischen Verbindungen brauchbar, insbesondere jedoch für komplizierte Substanzen von biochemischem Interesse, die sich auf anderen Wegen überhaupt nicht markieren lassen. Es gibt heute kaum eine Substanzklasse der organischen Chemie, deren Markierung mit Tritium nach diesem Verfahren noch nicht versucht worden ist <sup>72)</sup>. Die erhaltenen spezifischen Aktivitäten waren ganz unterschiedlich, die Verteilung des Tritiums über das Molekül <sup>67,73-75)</sup> - wie zu erwarten - unspezifisch und im allgemeinen vom Verbindungstyp nicht abhängig.

Bei den im Lauf dieser Arbeit markierten Verbindungen wurden deshalb keine bestimmten Substanzklassen bevorzugt, sondern, um zunächst die Wirksamkeit der abgeänderten Markierungsbedingungen zu ergründen, eine Reihe zur Verfügung

Tabelle 1 , Herstellung der Kohleadsorbate

| a<br>Nr | b<br>Ausgangslösungen                                                                          | c<br>+ g Kohle | d<br>Kohlebeladungen<br>mg, auf 1 g | e<br>%                    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 1       | <u>Cholesterin</u><br>200 mg in 30 ml Methanol<br>100 mg in 30 ml Methanol                     | 1<br>1         | 188 mg<br>92 mg                     | 15,4 %<br>8,4 %           |
| 2       | <u>Leucin</u><br>207 mg in 30 ml Wasser<br>200 mg in 30 ml Wasser<br>90 mg in 30 ml Wasser     | 0,5<br>1<br>1  | 199 mg<br>157 mg<br>60 mg           | 16,6 %<br>13,6 %<br>5,7 % |
| 3       | <u>Salicylsäure</u><br>599 mg in 30 ml Wasser<br>100 mg in 30 ml Wasser                        | 2<br>2         | 275 mg<br>47 mg                     | 21,6 %<br>4,5 %           |
| 4       | <u>Bernsteinsäure</u><br>1004 mg in 25 ml Wasser<br>600 mg in 25 ml Wasser                     | 2<br>2         | 283 mg<br>104 mg                    | 22 %<br>9,1 %             |
| 5       | <u>Maleinsäure</u><br>2000 mg in 20 ml Wasser<br>631 mg in 20 ml Wasser                        | 2<br>2         | 300 mg<br>115 mg                    | 23 %<br>10,2 %            |
| 6       | <u>Sorbinsäure</u><br>199 mg in 25 ml Wasser                                                   | 1              | 92 mg                               | 8,4 %                     |
| 7       | <u>p-Chlorbenzoesäure</u><br>402 mg in 50 ml Wasser                                            | 2              | 166 mg                              | 14,2 %                    |
| 8       | <u>Nikotinsäureamid</u><br>500 mg in 30 ml Wasser                                              | 2              | 154 mg                              | 14,2 %                    |
| 9       | <u>p-Acetphenetidin</u><br>600 mg in 30 ml Wasser<br>200 mg in 30 ml Wasser                    | 2<br>2         | 212 mg<br>95 mg                     | 17,5 %<br>8,7 %           |
| 10      | <u>Diaethylbarbitursäure</u><br>400 mg in 30 ml Wasser<br>200 mg in 30 ml Wasser               | 2<br>2         | 147 mg<br>68 mg                     | 12,8 %<br>6,7 %           |
| 11      | <u>Phenyläethylbarbitursr.</u><br>500 mg in 20 ml Methanol 50%<br>200 mg in 20 ml Methanol 50% | 2<br>2         | 228 mg<br>88 mg                     | 18,8 %<br>8,1 %           |
| 12      | <u>Ephedrin-HCl</u><br>600 mg in 30 ml Wasser<br>200 mg in 30 ml Wasser                        | 2<br>2         | 220 mg<br>88 mg                     | 18 %<br>8,1 %             |
| 13      | <u>Valin</u><br>800 mg in 30 ml Wasser<br>202 mg in 30 ml Wasser                               | 2<br>2         | 190 mg<br>90 mg                     | 16 %<br>8,2 %             |
| 14      | <u>Salicylsäure</u><br>302 mg in 30 ml Wasser                                                  | 2              | 132 mg                              | 11,7 %                    |
| 15      | <u>Sulfanilsäureamid</u><br>500 mg in 50 ml Wasser                                             | 3              | 153 mg                              | 13,3 %                    |
| 16      | <u>Rutin</u><br>500 mg in 50 ml Wasser                                                         | 3              | 135 mg                              | 12 %                      |
| 17      | <u>Tyrosin</u><br>180 mg in 40 ml Wasser                                                       | 1              | 157 mg                              | 13,6 %                    |
| 18      | <u>Testosteronpropionat</u><br>200 mg in 30 ml Methanol                                        | 1              | 118 mg                              | 10,6 %                    |
| 19      | <u>ß-Carotin</u><br>200 mg in 30 ml Methanol                                                   | 1              | 112 mg                              | 10,1 %                    |

stehender biochemisch oder pharmazeutisch gebräuchlicher Substanzen verwendet. Bei der Auswahl wurde lediglich beachtet, daß stark hydrophile Verbindungen wie z.B. Zucker, Polyalkohole u.a. von aktiver Kohle praktisch nicht adsorbiert werden. Wesentlich war, daß die Substanzen sich auch in kleinsten Mengen, wie sie in Eluat von Papierchromatogrammen anfallen, quantitativ erfassen ließen.

#### Herstellung der Kohleadsorbate:

Zur Herstellung der Kohleadsorbate wurden Lösungen der Substanzen mit Aktivkohlepulver oder -granulat geschüttelt. Adsorptionskohlen nehmen wegen ihrer hydrophoben Eigenschaften Substanzen am günstigsten aus wässriger Lösung auf<sup>76)</sup>. Soweit es möglich war, wurde deshalb Wasser zur Lösung der Substanzen benutzt. Nur in zwei Fällen mußte Methanol und in einem weiteren Fall eine Methanol-Wasser-Mischung (1+1) verwendet werden (s. Tabelle 1).

Um von einer Substanz Kohlebeladungen in verschiedener Höhe zu erhalten, wurden unterschiedlich konzentrierte Lösungen mit Kohle ausgeschüttelt. Angaben über die Konzentrationen der Ausgangslösungen sind in Tabelle 1 enthalten. Einzelheiten über die praktische Durchführung der Adsorptionen sind bei den Arbeitsanleitungen unter Teil G 2 auf Seite V beschrieben.

Die Höhe der Substanzaufnahme bei der Adsorption ließ sich über eine quantitative Bestimmung des nichtadsorbierten Substanzrestes in der von der Kohle abfiltrierten Lösung ermitteln. Die hierzu benutzten Bestimmungsmethoden werden in Tabelle 2 genannt. Außerdem wurden zur groben Kontrolle der dabei erhaltenen Werte in weiteren Anteilen der Filtrate die Trockenrückände bestimmt.

Die von 1 g Kohle aufgenommenen Substanzmengen sind in Spalte d der Tabelle 1 aufgeführt, Spalte e enthält die auf die prozentuale Beladungshöhe umgerechneten Werte.

Tabelle 2, Herstellung der Kohleadsorbate,  
Bestimmung des nichtadsorbierten Substanzanteiles,

| Nr. | Substanz               | Bestimmungsmethode                                    |
|-----|------------------------|-------------------------------------------------------|
| 1   | Cholesterin            | Digitoninfällung <sup>77)</sup>                       |
| 2   | Leucin                 | Formoltitration <sup>78)</sup>                        |
| 3   | Salizylsäure           | acidimetrisch                                         |
| 4   | Bernsteinsäure         | acidimetrisch                                         |
| 5   | Maleinsäure            | acidimetrisch                                         |
| 6   | Sorbinsäure            | acidimetrisch                                         |
| 7   | p-Chlorbenzoesäure     | spektralphotometrisch<br>bei 234 nm                   |
| 8   | Nikotinsäureamid       | spektralphotometrisch<br>bei 262 nm                   |
| 9   | p-Acetphenetidin       | spektralphotometrisch<br>bei 249 nm                   |
| 10  | Diaethylbarbitursäure  | acidimetrisch gegen <sup>79)</sup><br>Alizarin gelb R |
| 11  | Phenyläethylbarbiturs. | argentometrisch <sup>80)</sup>                        |
| 12  | Ephedrin-HCl           | gravimetrisch als<br>Oxalat                           |
| 13  | Valin                  | Formoltitration <sup>78)</sup>                        |
| 14  | Salizylsäure           | acidimetrisch                                         |
| 15  | Sulfanilsäureamid      | spektralphotometrisch<br>bei 262 nm                   |
| 16  | Rutin                  | spektralphotometrisch<br>bei 269 nm                   |
| 17  | Tyrosin                | Formoltitration <sup>78)</sup>                        |
| 18  | Testosteronpropionat   | spektralphotometrisch<br>bei 267 nm                   |
| 19  | $\beta$ -Carotin       | spektralphotometrisch<br>bei 451 nm                   |

#### Beschicken der Probenbehälter und Evakuieren der Apparatur:

Die zur Aufnahme der Proben vorgesehenen Behälter (s. Abbildung 2) wurden mit den gut getrockneten Substanzen beschickt und nach dem Befestigen an der Apparatur sorgfältig evakuiert bis auf einen Druck unter  $10^{-2}$  Torr.

Da meist mehrere Substanzen nebeneinander mit Tritium behandelt werden sollten und außerdem oft mehrere Kohlebeladungen einer Verbindung neben der Kontrollsubstanz unter gleichen Bedingungen markiert werden sollten, mußten die

Substanzen im Probenbehälter getrennt gelagert werden. Zu diesem Zweck wurden die Kohleadsorbate und Substanzproben einzeln in Glasröhrchen unterschiedlicher Weite eingewogen. Die Röhrchen waren am unteren Ende zugeschmolzen und wurden nach dem Füllen am anderen Ende mit einem Blättchen aus grobporigem Glasfaserfiltrierpapier abgedeckt.

Es wurde darauf geachtet, daß bei den zu vergleichenden Proben annähernd gleiche Mengen der Kontrollsubstanz und an Kohle adsorbierter Substanz im Reaktionsgefäß enthalten waren. Insbesondere stimmten die Einwaagen bei den unter normalen und tiefen Temperaturen markierten Proben genau überein.

Tabelle 3 enthält die Einwaagen an Kontrollsubstanzen und Kohleadsorbaten in der Reihenfolge der Markierungsversuche. Die zwischen den Querstrichen aufgeführten Proben befanden sich jeweils gleichzeitig in einem Probenbehälter und wurden gleichzeitig markiert. Bei den mit T bezeichneten Substanzen wurden gleiche Füllmengen in volumengleichen Probengefäßen sowohl bei Zimmertemperatur, als auch unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff mit Tritium behandelt.

Die Probengefäße wurden an der Apparatur über die Schliffverbindung P angeschlossen (s. Abb. 1). Nach Senken des Quecksilberniveaus auf C konnte die gesamte Apparatur mit Ausnahme des Tritiumvorratsgefäßes zunächst mit der Wasserstrahlpumpe, später in Kombination mit einer Quecksilberdiffusionspumpe evakuiert werden<sup>x)</sup>.

Während des Einwiegens in die Probenröhrchen und beim Einbringen in die Probenbehälter nehmen die vorher im Vakuumexsikkator aufbewahrten Kohlepräparate erhebliche

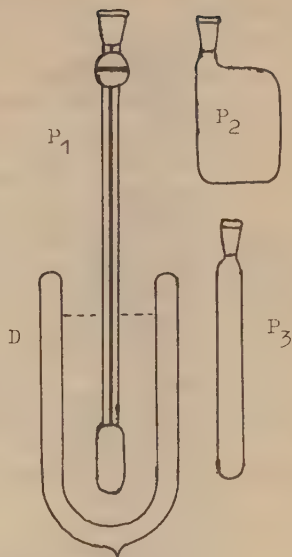


Abbildung 2  
 $P_1$  Probenbehälter zur Tieftemperaturmarkierung  
 $D$  Dewar-Gefäß für Stickstoff  
 $P_2$  u.  $P_3$  weitere Formen von Probenbehältern

Tabelle 3 , Einwaagen in Probenbehälter

| a  | b                                                                                                                                  | c                                                                                   |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Nr | Präparate                                                                                                                          | Einwaage in Probenbehälter                                                          |
| 1  | <u>Cholesterin</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 15,4 %<br>Kohladsorbat 8,4 %                                                | 45 mg<br>35 mg auf 185 mg Kohle<br>45 mg auf 488 mg Kohle                           |
| 2  | <u>Leucin</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 16,6 %<br>Kohladsorbat 13,6 %<br>Kohladsorbat 5,7 %                              | 35 mg<br>37 mg auf 184 mg Kohle<br>34 mg auf 220 mg Kohle<br>29 mg auf 481 mg Kohle |
| 3  | <u>Salicylsäure</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 21,6 %<br>Kohladsorbat 4,5 %                                               | 45 mg<br>46 mg auf 170 mg Kohle<br>23 mg auf 482 mg Kohle                           |
| 4  | <u>Bernsteinsäure</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 22 %<br>Kohladsorbat 9,1 %                                               | 50 mg<br>51 mg auf 179 mg Kohle<br>40 mg auf 383 mg Kohle                           |
| 5  | <u>Maleinsäure</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 23 %<br>Kohladsorbat 10,2 %                                                 | 115 mg<br>57 mg auf 188 mg Kohle<br>24 mg auf 208 mg Kohle                          |
| 6  | <u>Sorbinsäure</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 8,4 %                                                                       | 85 mg<br>84 mg auf 916 mg Kohle                                                     |
| 7  | <u>p-Chlorbenzoesäure</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 14,2 %                                                               | 65 mg<br>63 mg auf 380 mg Kohle                                                     |
| 8  | <u>Nikotinsäureamid</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 13,4 %                                                                 | 62 mg<br>69 mg auf 436 mg Kohle                                                     |
| 9  | <u>p-Acetphenetidin</u><br>Kontrollsubstanz, kristall.<br>Kontrollsubstanz, pulveris.<br>Kohladsorbat 17,5 %<br>Kohladsorbat 8,7 % | 50 mg<br>50 mg<br>47 mg auf 224 mg Kohle<br>52 mg auf 550 mg Kohle                  |
| 10 | <u>Diäthylbarbitursäure</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 12,8 %<br>Kohladsorbat 6,7 %                                       | 91 mg<br>82 mg auf 558 mg Kohle<br>84 mg auf 1232 mg Kohle                          |
| 11 | <u>Phenyläthylbarbiturat</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 18,8 %<br>Kohladsorbat 8,1 %                                      | 65 mg<br>51 mg auf 226 mg Kohle<br>18 mg auf 210 mg Kohle                           |
| 12 | <u>Ephedrin-HCl</u><br>Kontrollsubstanz, kristall.<br>Kontrollsubstanz, pulveris.<br>Kohladsorbat 18 %<br>Kohladsorbat 8,1 %       | 50 mg<br>50 mg<br>51 mg auf 231 mg Kohle<br>50 mg auf 566 mg Kohle                  |
| 13 | <u>Valin</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 16 %<br>Kohladsorbat 8,2 %                                                        | 50 mg<br>50 mg auf 265 mg Kohle<br>50 mg auf 550 mg Kohle                           |
| 14 | <u>Salicylsäure (T)</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 11,7 %                                                                 | 93 mg<br>93 mg auf 707 mg Kohle                                                     |
| 15 | <u>Sulfanilsäureamid (T)</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 13,3 %                                                            | 155 mg<br>155 mg auf 1013 mg Kohle                                                  |
| 16 | <u>Rutin (T)</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 12 %                                                                          | 115 mg<br>115 mg auf 857 mg Kohle                                                   |
| 17 | <u>Tyrosin (T)</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 13,6 %                                                                      | 45 mg<br>45 mg auf 288 mg Kohle                                                     |
| 18 | <u>Testosteronpropionat</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 10,6 %                                                             | 50 mg<br>50 mg auf 434 mg Kohle                                                     |
| 19 | <u><math>\beta</math>-Carotin</u><br>Kontrollsubstanz<br>Kohladsorbat 10,1 %                                                       | 40 mg<br>40 mg auf 357 mg Kohle                                                     |

Mengen an Luft und Wasserdampf auf. Beim Evakuieren werden diese Gase nur zögernd wieder freigegeben, so daß oft mehrtägiges Pumpen erforderlich war, um den Druck konstant unter  $10^{-2}$  Torr abfallen zu lassen. Auf jeden Fall wurde solange evakuiert, bis der mittels Widerstandsmanometer geprüfte Druck sich bei abgestellten Pumpen über mehrere Stunden nicht veränderte.

x) Während des Evakuierens der Kohlepräparate aus Kohlepulver war oft schon beim Unterdruck der Wasserstrahlpumpe ein als "Kochen" bezeichnetes Aufstäuben der feinen Kohleteilchen zu beobachten. Um ein Verunreinigen der Kohlepräparate durch die aufgewirbelten Kohleteilchen zu vermeiden, waren die Röhrchen mit den Kohlepulverproben nur bis zur halben Höhe gefüllt. Außerdem war es notwendig, das Sauggefälle mittels der beiden am Vakuumansatz der Apparatur befindlichen Hochvakuumhähne äußerst sorgfältig zu dosieren, um das Aufstäuben der Kohle innerhalb des freien Röhrchenvolumens begrenzt zu halten.

Bei Verwendung von Kohlegranulat entfiel diese Schwierigkeit.

#### Markierung mit Tritium:

Nachdem ausgedehnte Prüfungen ergeben hatten, daß die evakuierte Apparatur dicht war, wurde das im Vorratsgefäß gespeicherte Tritium über den Töplerpumpenansatz der Apparatur in die Probenbehälter gedrückt.

Das Tritium zur Markierung der ersten beiden Substanzen war in einem einfachen kugelförmigen Glasansatz der Apparatur aufbewahrt worden. Bei späteren Versuchen wurde es Urantritid gespeichert.

Für die Markierungsversuche ab Substanz 3 mußte das Urantritid - wie unter Teil G 1c<sub>3</sub> auf Seite IV beschrieben - zunächst durch Erhitzen auf  $425^{\circ}\text{C}$  thermisch gespalten werden. Das dabei freigesetzte Tritium oder ein Teil desselben wurde zunächst in die Gasbürette der Apparatur gesaugt und nach Schließen der Verbindung zum Uranröhrchen unter Anheben des Quecksilbers auf Niveau B in den jeweiligen Probenbehälter geleitet. Der sich dabei im Manometerrohr M einstellende Druck (Spalte d der Tabelle 4) wurde während der Markierungszeit mehrmals überprüft. In Tabelle 5 sind solche Druckkontrollen als Beispiele aufgeführt.

Bei den Zahlenwerten über die Tritiumaktivitäten in Spalte e der Tabelle 4 wurde angenommen, daß

Tabelle 4 , Markierung mit Tritium

| a<br>Nr | b<br>Substanzen     | c<br>Temperatur | d<br>Druck im Tritium-<br>Probenbe-<br>hälter<br>(mm Hg) | e<br>Tritium-<br>aktivität | f<br>Markie-<br>rungs-<br>zeit |
|---------|---------------------|-----------------|----------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| 1       | Cholesterin         | Z               | 245                                                      | 5 C                        | 4 Tage                         |
| 2       | Leucin              |                 |                                                          |                            |                                |
| 3       | Salicylsäure        |                 |                                                          |                            |                                |
| 4       | Bernsteinsäure      | Z               | 43                                                       | 5 C                        | 3 Tage                         |
| 5       | Maleinsäure         |                 |                                                          |                            |                                |
| 6       | Sorbinsäure         | Z               | 261                                                      | 5 C                        | 9 Tage                         |
| 7       | p-Chlorbenzoesäure  | Z               | 395                                                      | 5 C                        | 6 Tage                         |
| 8       | Nikotinsäureamid    | Z               | 418-385                                                  | 4,9 C                      | 5,5 Tage                       |
| 9       | p-Acetphenetidin    |                 |                                                          |                            |                                |
| 10      | Diaethylbarbitursr. | Z               | 180                                                      | 4,3 C                      | 11 Tage                        |
| 11      | Phenyläethylbarbit. |                 |                                                          |                            |                                |
| 12      | Ephedrin-HCl        |                 |                                                          |                            |                                |
| 13      | Valin               | Z               | 326-321                                                  | 4,3 C                      | 8 Tage                         |
| 14      | Salicylsäure        | Z               | 359                                                      | 3,3 C                      | 8 Tage                         |
| 14 T    | Salicylsäure        | -196°C          | 359                                                      | 3,3 C                      | 8 Tage                         |
| 15      | Sulfanilsäureamid   | Z               | 345                                                      | 3,2 C                      | 6 Tage                         |
| 15 T    | Sulfanilsäureamid   | -196°C          | 345                                                      | 3,2 C                      | 6 Tage                         |
| 16      | Rutin               | Z               | 335                                                      | 1,9 C                      | 9 Tage                         |
| 16 T    | Rutin               | -196°C          | 335                                                      | 1,9 C                      | 9 Tage                         |
| 17      | Tyrosin             | Z               | 390-409                                                  | 2,9 C                      | 5 Tage                         |
| 17 T    | Tyrosin             | -196°C          | 390-409                                                  | 2,9 C                      | 5 Tage                         |
| 18      | Testosteronpropr.   | Z               | 505-502                                                  | 1,8 C                      | 13 Tage                        |
| 19      | $\beta$ -Carotin    | Z               | 368-370                                                  | 1,4 C                      | 16 Tage                        |

Z = Zimmertemperatur

Tabelle 5 , Kontrolle des Tritiumdrucks im Probenbehälter

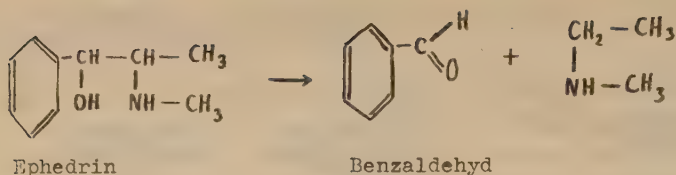
| Probenbehälter mit Substanzen | Druck im Probenbehälter (mm Hg) | abgelesen nach Tagen |
|-------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| p-Acetphenetidin              | 180                             | 0                    |
| Diaethylbarbitursäure         | 181                             | 1                    |
| Phenylaethylbarbiturs.        | 181                             | 2                    |
|                               | 180                             | 4                    |
|                               | 180                             | 5                    |
|                               | 180                             | 7                    |
|                               | 180                             | 9                    |
|                               | 180                             | 11                   |
| <hr/>                         |                                 |                      |
| Nikotinsäureamid              | 418                             | 0                    |
|                               | 418                             | 1                    |
|                               | 414                             | 2                    |
|                               | 403                             | 3                    |
|                               | 395                             | 4                    |
|                               | 385                             | 5,5                  |
| <hr/>                         |                                 |                      |

- 1.) das in Ampullen gelieferte Tritium in seiner durch Messung nicht überprüfbaren Aktivität den Angaben der Lieferfirma entsprach,
- 2.) beim thermischen Zerlegen des Urantritids stets die volle Tritiummenge in Freiheit gesetzt wurde.

Am Ende der Markierungszeit wurde durch mehrere Pumpbewegungen mit dem Quecksilber der Töplerpumpe das Tritium aus dem Probengefäß zurück in den Vorratsbehälter geleitet und dort - wenn vorgesehen - wieder an Uran gebunden.

Mehrstündiges Evakuieren mit der Quecksilberdampfstrahlpumpe entfernte auch die geringsten im Probengefäß noch verbliebenen Tritiumgasreste sowie die vom Uran nicht aufgenommenen gasförmigen Verunreinigungen.

Während des Markierungsvorganges waren sichtbare Veränderungen der Substanzen nur beim Ephedrin-HCl beobachtet worden. Die beiden Kontrollsubstanzen dieser Verbindung färbten sich leicht gelblich. Nach dem Abnehmen des Probenbehälters war ein schwacher Geruch nach Benzaldehyd wahrzunehmen :



### Markierungsversuche bei tiefen Temperaturen:

Die Probenbehälter der zur Markierung bei tiefen Temperaturen vorgesehenen Substanzen Salicylsäure, Sulfanilsäureamid, Rutin und Tyrosin waren an das Ende eines 80 cm langen starkwandigen Kapillarrohres angeschmolzen (s. Abb. 2). Ein kurz vor dem Verbindungsschliff zur Apparatur eingeschalteter Hahn gestattete das Abnehmen des Probengefäßes nach dem Füllen mit Tritium. Während der Markierung tauchte der Probenbehälter in ein 5 l -Dewar-Gefäß mit flüssigem Stickstoff<sup>x)</sup>. Durch Adsorption an die aktive Kohle sinkt dabei der Tritiumdruck im Probengefäß unter einen Wert von 1 Torr.

Die gleichen Substanzeinwaagen wurden einmal bei Zimmertemperatur (Z) und bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs (-196°C) in praktisch volumengleichen Probenbehältern unter Anwendung gleicher Tritiumaktivitäten und gleichem Ausgangsdruck bei 20°C gleichlang tritiert.

---

<sup>x)</sup> Flüssiger Stickstoff wurde nicht wegen des unbedeutend niedrigeren Siedepunktes (-196°C) der flüssigen Luft (-194°C) als Kühlmittel vorgezogen, sondern aus Sicherheitsgründen. Bei Glasbruch des Probenbehälters konnten sich so keine explosiven Mischungen von Kohlepulver mit der sauerstoffhaltigen flüssigen Luft bilden.

### 3. Aufarbeitung und Messung der markierten Proben:

Aus den von der Apparatur abgenommenen Probenbehältern konnten nach Aufsprengen die Substanzröhrchen wieder entnommen werden.

Die an Kohle adsorbierten Proben wurden über vorbereitete Filtriereinrichtungen mit geeigneten, bis zum Sieden erhitzten Lösungsmitteln mehrmals übergossen und dabei eluiert. Die folgende Tabelle 6 enthält in Spalte c die verwendeten Lösungsmittel, in Spalte d die prozentualen Extraktwerte bezogen auf die Gesamtmenge der kohleadsorbierten Substanz<sup>x)</sup>.

Durch mehrmaliges Aufnehmen und Wiedereindunsten der Extrakte wurde das in den markierten Substanzen labil gebundene "auswaschbare" Tritium ebenso wie noch vorhandene flüchtige Verunreinigungen entfernt. Die Kontrollsubstanzen wurden in gleicher Weise behandelt, um deren Aktivitäten mit den Kohleextrakten vergleichen zu können. Extrakt und Lösung des empfindlichen  $\beta$ -Carotins wurden nicht zur Trockene eingedunstet; der Substanzgehalt ließ sich spektralphotometrisch bestimmen.

#### Aktivitätsbestimmungen der Rohsubstanzen:

Die Aktivitäten der markierten Substanzen wurden im Methandurchflußzähler FH 407 der Firma Friesseke und Hoepfner - wie unter den Arbeitsvorschriften unter G 3 auf Seite VI beschrieben - gemessen.

Die Zählausbeute der Meßanordnung betrug bei jeweils 5  $\mu$ g Substanz in den Zählschälchen ( $\varnothing = 3$  cm) 43,5 % der Kernzerfälle. Bei jeder Messung wurden mindestens 1000 Impulse gezählt. Der statistische Fehler  $s = \sqrt{N}$  <sup>xx)</sup> lag dann bei  $\pm 3$  %. Bei den zur Errechnung der Aktivitätswerte benutzten Impulsraten handelte es sich um arithmetische Mittel aus mindestens drei vergleichbar beieinanderliegenden Meßwerten.

---

<sup>x)</sup> Auch unbeladene Aktivkohle ergibt beim Behandeln mit Lösungsmitteln wägbare Extrakte. Die vorher für die verschiedenen Lösungsmittel ermittelten Extrakte wurden beim Ausrechnen der Werte in Spalte d der Tabelle 6 berücksichtigt.

<sup>xx)</sup>  $N$  = insgesamt bei der Messung registrierte Impulszahl

Tabelle 6 , Extraktion der Kohlepräparate

| Nr | b<br>Präparate                    | c<br>Lösungsmittel                  | d<br>% Substanz<br>extrahiert |
|----|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| 1  | <u>Cholesterin</u>                |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 15,4 %              | 30 ml Methanol                      | 66 %                          |
|    | Kohleadsorbat 8,4 %               |                                     | 58 %                          |
| 2  | <u>Leucin</u>                     |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 16,6 %              | 30 ml Ammoniakfl. 3 %               | 73 %                          |
|    | Kohleadsorbat 13,6 %              |                                     | 69 %                          |
|    | Kohleadsorbat 5,7 %               |                                     | 48 %                          |
| 3  | <u>Salicylsäure</u>               |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 21,6 %              | 30 ml Chloroform/<br>Methanol 1 + 1 | 67 %                          |
|    | Kohleadsorbat 4,5 %               |                                     | 56 %                          |
| 4  | <u>Bernsteinsäure</u>             |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 22 %                | 30 ml Äthanol                       | 67 %                          |
|    | Kohleadsorbat 9,1 %               |                                     | 68 %                          |
| 5  | <u>Maleinsäure</u>                |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 23 %                | 30 ml Methanol/<br>Äthanol 1 + 1    | 73 %                          |
|    | Kohleadsorbat 10,2 %              |                                     | 58 %                          |
| 6  | <u>Sorbinsäure</u>                |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 8,4 %               | 50 ml Methanol                      | 43 %                          |
| 7  | <u>p-Chlorbenzoesäure</u>         |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 14,2 %              | 25 ml Methanol                      | 46 %                          |
| 8  | <u>Nikotinsäureamid</u>           |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 13,4 %              | 50 ml Äthanol                       | 48 %                          |
| 9  | <u>p-Acetphenetidin</u>           |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 17,5 %              | 30 ml Methanol                      | 64 %                          |
|    | Kohleadsorbat 8,7 %               |                                     | 46 %                          |
| 10 | <u>Diäthylbarbiturat.</u>         |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 12,8 %              | 30 ml Methanol                      | 50 %                          |
|    | Kohleadsorbat 6,7 %               |                                     | 34 %                          |
| 11 | <u>Phenyläthylbarbiturat.</u>     |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 18,8 %              | 30 ml Methanol                      | 78 %                          |
|    | Kohleadsorbat 8,1 %               |                                     | 59 %                          |
| 12 | <u>Ephedrin-HCl</u>               |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 18 %                | 30 ml Methanol                      | 53 %                          |
|    | Kohleadsorbat 8,1 %               |                                     | 36 %                          |
| 13 | <u>Valin</u>                      |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 16 %                | 30 ml Ammoniakfl. 3 %               | 56 %                          |
|    | Kohleadsorbat 8,2 %               |                                     | 44 %                          |
| 14 | <u>Salicylsäure</u>               |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 11,7 %              | 30 ml Chloroform/<br>Methanol 1+1   | 26 %                          |
|    | Kohleadsorbat 11,7 % T            |                                     | 37 %                          |
| 15 | <u>Sulfanilsäureamid</u>          |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 13,3 %              | 50 ml Äther/<br>Aceton 1+1          | 68 %                          |
|    | Kohleadsorbat 13,3 % T            |                                     | 55 %                          |
| 16 | <u>Rutin</u>                      |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 12 %                | 30 ml Ammoniakfl. 3 %               | 56 %                          |
|    | Kohleadsorbat 12 % T              |                                     | 51 %                          |
| 17 | <u>Tyrosin</u>                    |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 13,6 %              | 30 ml Ammoniakfl. 3 %               | 53 %                          |
|    | Kohleadsorbat 13,6 % T            |                                     | 49 %                          |
| 18 | <u>Testosteronpropionat</u>       |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 10,6 %              | 30 ml Methanol                      | 54 %                          |
| 19 | <u><math>\beta</math>-Carotin</u> |                                     |                               |
|    | Kohleadsorbat 10,1 %              | 25 ml Methanol                      | 45 %                          |

Aus den Impulsraten pro Minute errechnete sich die Zahl der Kernzerfälle beim Multiplizieren mit 2,3, dem Wirkungsfaktor der Meßanordnung. Die Aktivitäten in  $\mu\text{C}$  ergaben sich nach Division der Kernzerfallsraten pro Minute durch  $2,22 \cdot 10^6$ . Für die Angabe der "spezifischen Aktivitäten" wurden die Werte in  $\mu\text{C}$  auf 1 mg der Substanz umgerechnet. Bei den Ergebnissen der Messungen sind  $\pm 6\%$  als Fehlerbereich anzusetzen.

Die Resultate der Aktivitätsmessungen an den vom labilen Tritium befreiten Rohsubstanzen sind in Tabelle 8, Spalte d enthalten.

#### Reinigung der Rohsubstanzen:

Um die Kohleextrakte bzw. Eindampfrückstände der Kontrollsubstanzen von aktiven und inaktiven Verunreinigungen zu befreien, wurden verschiedene Methoden erprobt, z.B. Umkristallisieren, Umsublimieren oder selektives Ausschütteln mit geeigneten Lösungsmitteln aus bestimmten Lösungsphasen. Die geringen Substanzmengen - in der Regel wurden nur Teilmengen der Kohleextrakte aufgearbeitet - ließen sich dabei oft erst nach dem Verdünnen mit den entsprechenden inaktiven Substanzen handhaben. Dabei wurde naturgemäß die bei S bei den Kohleadsorbaten erzielte Aktivitätserhöhung wieder vermindert oder aufgehoben. Außerdem gelang es mit diesen Methoden nur in wenigen Fällen chromatographisch reine Substanzen zu erhalten.

In Abbildung 3 sind die Aktivitätsverteilungen von Papierchromatogrammen einer durch fünfmaliges Umkristallisieren gereinigten Salizylsäure dem Rohextrakt gegenübergestellt. Man erkennt daß nach dieser Behandlung die Salizylsäure noch immer radioaktive Verunreinigungen enthält.

Eine befriedigende Rei-

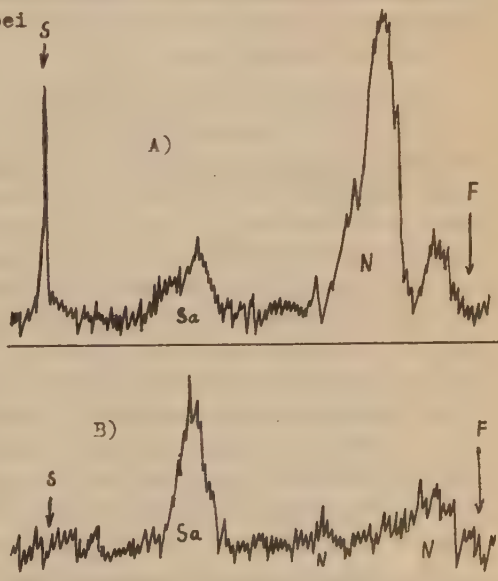


Abbildung 3. Salizylsäure (Sa)

A) Kontrollsubstanz ungereinigt

B) Kontrollsubstanz 5 mal umkristallisiert

N = radioaktive Verunreinigungen

nigung von Rohsubstanzen durch die schon genannten Methoden gelang nur bei:

- 1.) Bernsteinsäure, durch mehrfaches Fällen als Bariumsalz,
- 2.) den Kohleextrakten der Diaethylbarbitursäure, durch Ausschütteln mit Äther aus schwefelsaurer wässriger Phase,
- 3.) Rutin, durch "Auswaschen" der Substanz mit Wasser und Äthanol.

#### Chromatographische Auftrennung der Rohsubstanzen:

Das Ziel, radiopapierchromatographisch reine Substanzen zu erhalten, läßt sich mit sicherem Erfolg durch chromatographische Trennungen erreichen. Mit Hilfe der Papier- und Dünnschichtchromatographie können Mengen bis zu einigen Milligramm schonend aufgearbeitet werden. Voraussetzung bei diesem Reinigungsverfahren ist eine ausreichende Trennmöglichkeit der Substanz von ihren Verunreinigungen innerhalb der Laufstrecke des Chromatogramms. Weil die Mehrzahl der radioaktiven Begleitsubstanzen sich entweder in der Nähe des Startpunktes oder an der Lösungsmittelfront ansammelte, wurden vorzugsweise solche Laufmittelgemische verwendet, bei denen die  $R_F$ -Werte der zu reinigenden Substanz zwischen 0,4 und 0,6 lagen.

#### Papierchromatographische Trennungen:

Zu diesen Trennungen wurden 15 cm breite Papierstreifen (Schleicher & Schüll 2045 a G1) verwendet, auf deren Startlinie über eine Strecke von 10 cm Rohsubstanzmengen mit einer Aktivität von 0,5 bis 1,5  $\mu\text{C}$  möglichst gleichmäßig verteilt aufgetragen. Ein gesonderter Papierstreifen diente zum vergleichenden Mitchromatographieren einer Kontrollprobe inaktiver Substanz. Auf diesem Probestreifen konnte nach Anfärben mit Sprühreagentien (Tabelle 7, Spalte e) der auch für das Radiopapierchromatogramm geltende  $R_F$ -Wert der abzutrennenden Substanz festgelegt werden.

Alle Chromatogramme wurden mit aufsteigendem Laufmittelgemisch entwickelt (Laufzeit 18 - 20 h, Laufstrecke mindestens 20 cm). Tabelle 7 nennt die verwendeten Lösungsmittelsysteme sowie die  $R_F$ -Werte der chromatographierten Verbindungen.

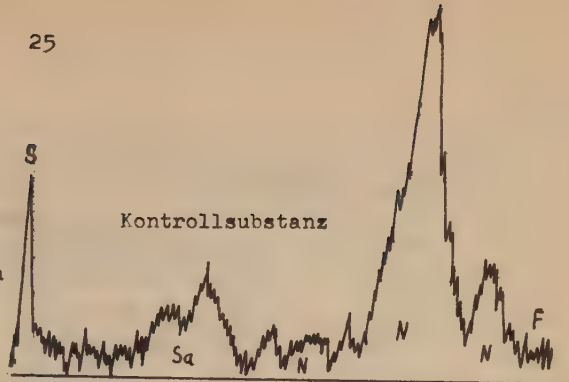
Zur Messung der Aktivitätsverteilung wurde ein 3 cm breiter Streifen aus dem radioaktiven Papierchromatogramm herausgeschnitten, von dem Radiopapierchromatographen der Firma Friesseke & Hoepfner unter dem Eintrittsspalt eines

# Abbildung 4 Salizylsäure (Sa)

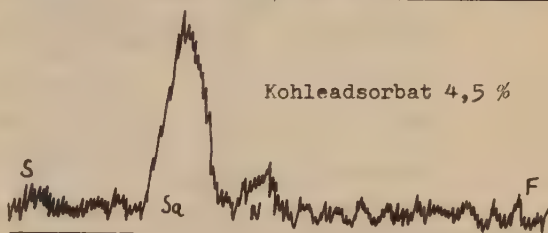
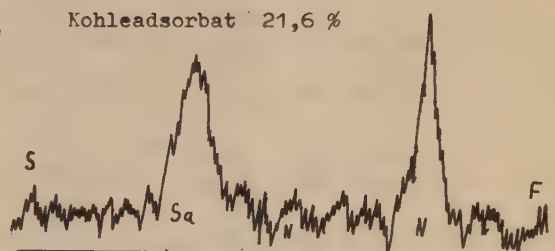
Aktivitätsverteilung  
der ungereinigten,  
aber vom labilen  
Tritium befreiten  
Substanzen auf  
Papierchromatogrammen

Die Kohleadsorbate  
zeigen gegenüber der  
Kontrollsubstanz  
geringere Anteile  
an radioaktiven Ver-  
unreinigungen (N).

Außerdem sind diese  
von der Beladungshöhe  
der Kohle abhängig.



Methanstromzählers  
(FH 407) kontinuier-  
lich vorbeitrans-  
portiert und die  
gemessenen Impuls-  
raten mit einem  
Linienschreiber  
aufgezeichnet. Bei-  
spiele der dabei  
erhaltenen Aktivi-  
tätsverteilungs-  
kurven zeigen die  
Abbildungen 3 - 5,  
7 - 9 und 11 - 14.



Wenn die Kurven keine eindeutige Trennung der Substanz von den radioaktiven Verunreinigungen erkennen ließen, mußte die chromatographische Auftrennung mit einem anderen Laufmittelgemisch wiederholt werden.

Aus den Aktivitätsverteilungskurven ließ sich die Summe der Fremdaktivitäten planimetrisch ermitteln und als prozentualer Anteil der Gesamtaktivität bestimmen. Die auf diese Weise berechneten Verunreinigungsrate der chromatographierten Rohsubstanzen sind in Spalte e der Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 7 , Steigflüssigkeiten für Papier- und Dünnschicht-  
chromatogramme.

| a<br>Nr | b<br>Substanzen          | c<br>Laufmittel                                                                          | d<br>R <sub>f</sub> -Wert | e<br>Sprühreagenz                                  |
|---------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------------------------------|
| 1       | Cholesterin              | Cyclohexan 70 <sup>81)</sup><br>Essigester 30                                            | 0,52                      | Phosphorwolframsäure in Äthanol                    |
| 2       | Leucin                   | n-Butanol 4 <sup>82)</sup><br>Äthanol 1<br>Wasser 1                                      | 0,66                      | Ninhydrin                                          |
| 3       | Salicylsäure             | n-Butanol 960 <sup>83)</sup><br>Äthanol 264<br>NH <sub>3</sub> -Puffer 456 <sup>a)</sup> | 0,33                      | FeCl <sub>3</sub> u. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| 4       | Bernsteinsäure           | n-Butanol 4 <sup>84)</sup><br>Äthanol 1<br>Wasser 5                                      | 0,45                      | Bromphenolblau                                     |
| 5       | Maleinsäure              | n-Propanol 5 <sup>85)</sup><br>Eucalyptol 5<br>Ameisensäure 2 (25%)                      | 0,47                      | Bromphenolblau                                     |
| 6       | Sorbinsäure              | n-Butanol 960 <sup>83)</sup><br>Äthanol 264<br>NH <sub>3</sub> -Puffer 456 <sup>a)</sup> | 0,6                       | FeCl <sub>3</sub> u. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| 7       | p-Chlorbenzoesäure       | n-Butanol 960 <sup>83)</sup><br>Äthanol 264<br>NH <sub>3</sub> -Puffer 456 <sup>a)</sup> | 0,6                       | FeCl <sub>3</sub> u. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| 8       | Nikotinsäureamid         | n-Butanol, 86)<br>wassergesättigt                                                        | 0,63                      | BrCN + Benzidin                                    |
| 9       | p-Acetphenetidin         | n-Butanol 4<br>Eisessig 1<br>Wasser 5                                                    | 0,7                       | HNO <sub>3</sub> (25%)                             |
| 10      | Diaethylbarbiturat       | n-Butanol 84 <sup>87)</sup><br>Ammoniakfl. 8 (25%)<br>Wasser 8                           | 0,5                       | HgNO <sub>3</sub> ammoniak.                        |
| 11      | Phenyläthylbarbitursäure | n-Butanol 84 <sup>87)</sup><br>Ammoniakfl. 8 (25%)<br>Wasser 8                           | 0,6                       | HgNO <sub>3</sub> ammoniak.                        |
| 12      | Ephe-drin-HCl            | n-Butanol 4<br>Eisessig 1<br>Wasser 5                                                    | 0,55                      | Ninhydrin                                          |
| 13      | Valin                    | n-Butanol 9 <sup>88)</sup><br>Eisessig 1<br>Wasser 1                                     | 0,35                      | Ninhydrin                                          |
| 14      | Salicylsäure             | n-Butanol, 89)<br>wassergesättigt                                                        | 0,6                       | FeCl <sub>3</sub> u. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| 15      | Sulfanilsäureamid        | n-Butanol 5<br>Eisessig 1<br>Wasser 4                                                    | 0,47                      | p-Dimethylamino-benzaldehyd                        |
| 16      | Rutin                    | n-Butanol 4 <sup>90)</sup><br>Eisessig 1<br>Wasser 5                                     | 0,5                       | -                                                  |
| 17      | Tyrosin                  | n-Butanol 3 <sup>91)</sup><br>Ammoniakfl. 1 (3%)                                         | 0,5                       | Ninhydrin                                          |
| 18      | Testosteronpropionat     | Cyclohexan 70 <sup>81)</sup><br>Essigester 30                                            | 0,45                      | Phosphors. 15%                                     |
| 19      | ß-Carotin                | Petroläther 90<br>Chloroform 10                                                          | 0,5                       | -                                                  |

a) NH<sub>3</sub>-Puffer = 36,2 g Ammoniumkarbonat  
107,5 ml Ammoniakfl. 25 %  
Wasser ad 1 l

Tabelle 8 , Chromatographische Auftrennung der Rohsubstanzen,  
Aktivitäten der Rohsubstanzen

| a    | b                               | c                 | d                                     | e                   |
|------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------|
| Nr.  | Präparate                       | aufgetr.<br>µC/cm | Aktivität der<br>Rohsubstanz<br>µC/mg | Fremdaktivität<br>% |
| 1    | <u>Cholesterin</u>              |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 50                | 7,2                                   | 83 %                |
|      | Kohleabsorbat 15,4 %            | 50                | 3,2                                   | 50 %                |
|      | Kohleabsorbat 8,4 %             | 50                | 7,0                                   | 41 %                |
| 2    | <u>Leucin</u>                   |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 5                 | 26,4                                  | 17 %                |
|      | Kohleabsorbat 16,6 %            | 40                | 3,4                                   | 96 %                |
|      | Kohleabsorbat 13,6 %            | 40                | 2,8                                   | 100 %               |
|      | Kohleabsorbat 5,7 %             | 40                | 3,8                                   | 100 %               |
| 3    | <u>Salicylsäure</u>             |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 900               | 0,08                                  | 86 %                |
|      | Kohleabsorbat 21,6 %            | 50                | 0,24                                  | 45 %                |
|      | Kohleabsorbat 4,5 %             | 50                | 0,27                                  | 15 %                |
| 4    | <u>Bernsteinsäure</u>           |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 1000              | 0,015                                 | 61 %                |
|      | Kohleabsorbat 22 %              | 1000              | 0,05                                  | 59 %                |
|      | Kohleabsorbat 9,1 %             | 1000              | 0,068                                 | 37 %                |
| 5    | <u>Maleinsäure</u>              |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 100               | 1,01                                  | 73 %                |
|      | Kohleabsorbat 23 %              | 100               | 1,5                                   | 33 %                |
|      | Kohleabsorbat 10,2 %            | 50                | 2,51                                  | 19 %                |
| 6    | <u>Sorbinsäure</u>              |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 50                | 2,2                                   | 100 %               |
|      | Kohleabsorbat 8,4 %             | 50                | 2,1                                   | 100 %               |
| 7    | <u>p-Chlorbenzoesäure</u>       |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 100               | 0,52                                  | 56 %                |
|      | Kohleabsorbat 14,2 %            | 50                | 0,98                                  | 26 %                |
| 8    | <u>Nikotinsäureamid</u>         |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 10                | 4,0                                   | 68 %                |
|      | Kohleabsorbat 13,4 %            | 10                | 16,2                                  | 49 %                |
| 9    | <u>p-Acetphenetidin</u>         |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz, Krist.        | 50                | 0,24                                  | 81 %                |
|      | Kontrollsubstanz, pulv.         | 50                | 0,24                                  | 80 %                |
|      | Kohleabsorbat 18,8 %            | 50                | 0,28                                  | 79 %                |
|      | Kohleabsorbat 8,7 %             | 30                | 0,52                                  | 61 %                |
| 10   | <u>Diäthylbarbitursäure</u>     |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 10                | 8,1                                   | 75 %                |
|      | Kohleabsorbat 12,8 %            | 10                | 6,2                                   | 45 %                |
|      | Kohleabsorbat 6,7 %             | 10                | 9,4                                   | 44 %                |
| 11   | <u>Phenyläthylbarbitursäure</u> |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 100               | 0,42                                  | 77 %                |
|      | Kohleabsorbat 18,8 %            | 100               | 0,41                                  | 62 %                |
|      | Kohleabsorbat 8,1 %             | 50                | 0,87                                  | 38 %                |
| 12   | <u>Ephedrin-HCl</u>             |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz, krist.        | 50                | 1,0                                   | 90 %                |
|      | Kontrollsubstanz, pulv.         | 50                | 1,2                                   | 86 %                |
|      | Kohleabsorbat 18 %              | 20                | 2,4                                   | 69 %                |
|      | Kohleabsorbat 8,1 %             | 20                | 2,6                                   | 30 %                |
| 13   | <u>Valin</u>                    |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 1000              | 0,018                                 | 26 %                |
|      | Kohleabsorbat 16 %              | 1000              | 0,03                                  | 100 %               |
|      | Kohleabsorbat 8,2 %             | 1000              | 0,026                                 | 100 %               |
| 14   | <u>Salicylsäure</u>             |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 100               | 0,16                                  | 82 %                |
|      | Kohleabsorbat 11,7 %            | 50                | 0,27                                  | 58 %                |
| 14 T | Kontrollsubstanz                | 1000              | 0,008                                 | —                   |
|      | Kohleabsorbat 11,7 %            | 50                | 0,83                                  | 35 %                |
| 15   | <u>Sulfanilsäureamid</u>        |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 100               | 0,62                                  | 55 %                |
|      | Kohleabsorbat 13,3 %            | 40                | 2,3                                   | 45 %                |
| 15 T | Kontrollsubstanz                | —                 | 0,1                                   | —                   |
|      | Kohleabsorbat 13,3 %            | 10                | 11,4                                  | 17 %                |
| 16   | <u>Rutin</u>                    |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 50                | 1,1                                   | 76 %                |
|      | Kohleabsorbat 12 %              | 20                | 2,2                                   | 27 %                |
| 16 T | Kontrollsubstanz                | —                 | 0,084                                 | —                   |
|      | Kohleabsorbat 12 %              | 10                | 6,4                                   | 23 %                |
| 17   | <u>Tyrosin</u>                  |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 50                | 2,3                                   | 74 %                |
|      | Kohleabsorbat 13,6 %            | 50                | 1,7                                   | 88 %                |
| 17 T | Kontrollsubstanz                | —                 | 0,002                                 | —                   |
|      | Kohleabsorbat 13,6 %            | 50                | 1,9                                   | 98 %                |
| 18   | <u>Testosteronpropionat</u>     |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 40                | 3,1                                   | 91 %                |
|      | Kohleabsorbat 10,6 %            | 40                | 3,2                                   | 70 %                |
| 19   | <u>β-Carotin</u>                |                   |                                       |                     |
|      | Kontrollsubstanz                | 5                 | 45,3                                  | 88 %                |
|      | Kohleabsorbat 10,1 %            | 7                 | 35,3                                  | 65 %                |

T = Tieftemperaturmarkierte Substanzen

Abbildung 5,  
Diaethylbarbitursäure (DB)

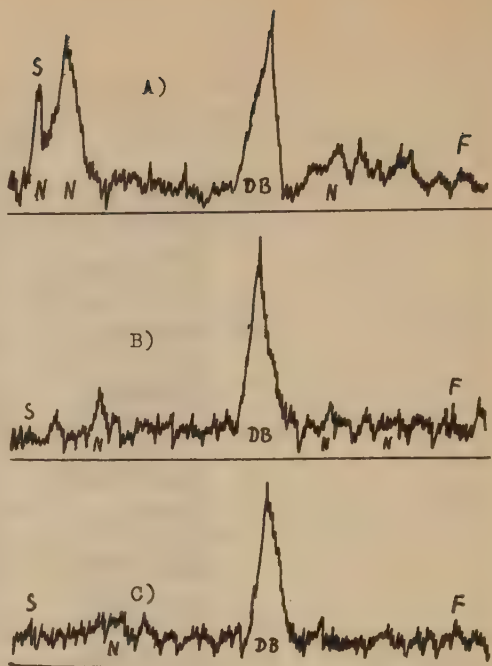
Aktivitätsverteilung  
der ungereinigten, aber  
von labilen Tritium  
befreiten Substanzen  
auf Papierchromato-  
grammen.

A) Kontrollsubstanz

B) Kohleadsorbat 12,8 %

C) Kohleadsorbat 6,7 %

Die Kohleadsorbate  
zeigen gegenüber der  
Kontrollsubstanz ge-  
ringere Anteile an  
radioaktiven Verunrei-  
nungen (N). Die Bela-  
dungshöhe der Kohle hat  
hier nur unbedeutenden  
Einfluß auf die Ver-  
unreinigungsraten.



#### Reinigung durch Dünnschichtchromatographie:

Viele lipophile Substanzen lassen sich auf Papierchromatogrammen nicht ausreichend scharf trennen. Versuche mit paraffin- bzw. phenylcellosolveimprägnierten Papieren zur Reinigung von Cholesterin verliefen unbefriedigend.

Cholesterin, Testosteronpropionat und  $\beta$ -Carotin wurden deshalb auf Dünnschichtplatten chromatographisch getrennt. Als Adsorptionsmittel eignete sich eine kurz vor dem Auftragen und Entwickeln der Substanzen frisch aktivierte Schicht von Kieselgel G für alle Substanzen. In Tabelle 7, Spalte c werden die in Vorversuchen mit inaktiver Substanz ausprobierten Laufmittel genannt. Es wurden wieder Gemische bevorzugt, die die zu reinigende Substanz bis etwa in die Mitte ( $R_F$ -Wert = 0,5) der Gesamtlaufstrecke steigen ließen.

Auch hier wurden neben den aktiven Rohsubstanzen inaktive Vergleichsproben auf gesonderten Dünnschichtplatten mit-chromatographiert. Die zum Anfärben der farblosen Verbindungen Cholesterin und Testosteronpropionat verwendeten Sprühreagentien sind in Spalte e der Tabelle 7 zusammengestellt.

Wegen der geringeren Zähl- ausbeute bei Aktivitätsmessungen an Dünnschichtplatten mußten etwa 0,1 - 0,3  $\mu\text{C}$  der Substanz auf jeden Zentimeter der Startlinie aufgetragen werden, um gut auswertbare Aktivitätsverteilungskurven zu erzielen. Zur Messung zog der Synchronmotor des Radiopapierchromatographen die Dünnschichtplatte auf einem Transportwagen unter einem besonders konstruierten Methandurchflußzähler<sup>33)</sup> vorbei.

Aus den vom Linienschreiber aufgezeichneten Aktivitätsverteilungskurven (Beispiele Abbildung 6 und 10) ließen sich die Aktivitätsanteile der Verunreinigungen wieder planimetrisch ermitteln. Ihre in Prozenten ausgedrückten Werte finden sich in Spalte e der Tabelle 8.

#### Bestimmung der spezifischen Aktivitäten:

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität einer radio-aktiven Verbindung ist neben der Aktivitätsmessung eine genaue quantitative Substanzbestimmung erforderlich.

Aus den Radiopapierchromatogrammen wurde dazu der mittlere Teil der der Substanz zuzuordnenden  $R_F$ -Zone herausgeschnitten und mit wenigen Millilitern Methanol eluiert.

Bei Dünnschichtchromatogrammen wurden die entsprechenden  $R_F$ -Zonen mit einem Spatel von der Glasplatte abgehoben,

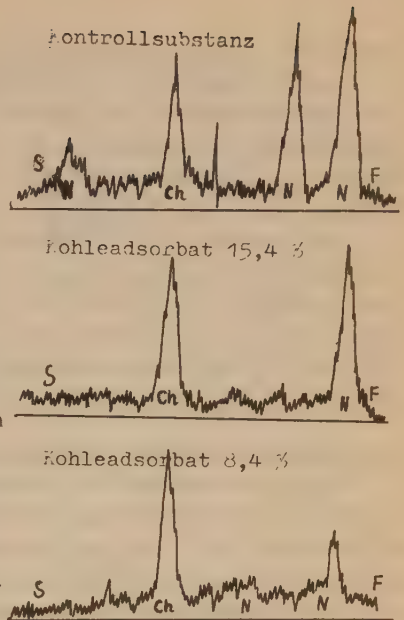


Abbildung 6, Cholesterin (Ch)

Die Kohleadsorbate zeigen gegenüber der Kontrollsubstanz verschiedene und vor allem geringere Anteile an radio-aktiven Verunreinigungen N.

auf einem Filter gesammelt und ebenfalls extrahiert.

In den Eluaten wurden die Substanzmengen photometrisch bestimmt (Zeiss PMQ II), die den Extinktionswerten entsprechenden Gewichtsmengen Eichkurven entnommen. In Tabelle 9, Spalte c sind Wellenlänge bzw. Farbreaktion der photometrischen Messungen angegeben.

Nach Ermitteln der Substanzkonzentrationen ließen sich aus den gleichen Eluaten nach Abdunsten des Lösungsmittels die Radioaktivitäten bestimmter Substanzmengen messen, wie unter Teil G 2 auf Seite VI beschrieben.

Die auf  $\mu\text{C} / \text{mg}$  bezogenen spezifischen Aktivitäten sind in Spalte d der Tabelle 9 aufgeführt.

#### Kontrolle der Reinheit, Kontrolle der spezifischen Aktivität:

Nach dem Bestimmen der Substanzmenge und der Aktivität wurden die Eluate der Papier- bzw. Dünnschichtchromatogramme auf ein möglichst kleines Volumen wiedereingedampft und ein zweites Mal chromatographiert. Zur Kontrolle der Reinheit wurde erneut durch kontinuierliche Messung die Aktivitätsverteilungskurve aufgezeichnet. Abbildung 7 zeigt ein Beispiel solcher Kurven.

In den Eluaten dieser Chromatogramme ließen sich durch photometrische Substanzbestimmungen sowie erneute Aktivitätsmessungen die spezifischen Aktivitäten nochmals überprüfen. Die hierbei gemessenen Werte sind in Spalte d 2 der Tabelle 9 den zuerst erhaltenen Werten gegenübergestellt. Einige Substanzen wurden ein drittes Mal chromatographiert. Ein

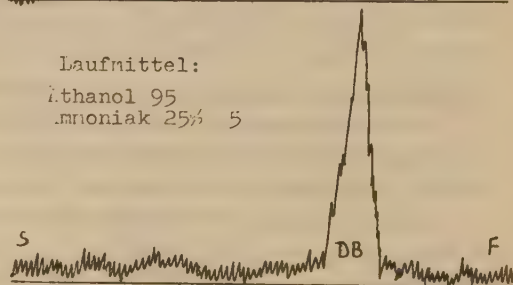
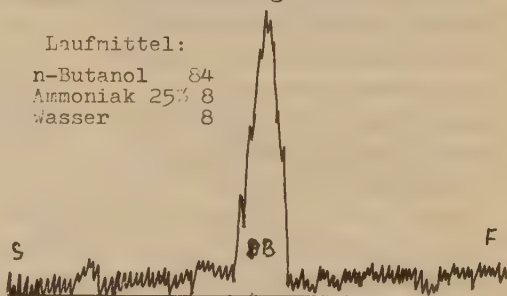


Abbildung 7, Diäthylbarbitursäure  
Chromatographie der gereinigten Substanz mit verschiedenen Laufmitteln.

hierbei verwendetes neues Laufmittel ergab andere  $R_F$ -Werte (Abb.7).

Tabelle 9, Bestimmung der spezifischen Aktivitäten

| a<br>Nr | b<br>Präparate                  | c<br>photometrische<br>Bestimmung | d<br>Spezifische Aktivit.<br>µG/mg |        |
|---------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------|
|         |                                 |                                   | 1.                                 | 2.     |
| 1       | <u>Cholesterin</u>              |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 267 nm                        | 0,81                               | 0,82   |
|         | Kohleabsorbat 15,4 %            |                                   | 1,4                                | 1,35   |
|         | Kohleabsorbat 8,4 %             |                                   | 3,2                                | 3,09   |
| 2       | <u>Leucin</u>                   |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | nach Reaktion                     | 21                                 | 21,3   |
|         | Kohleabsorbat 16,6 %            | mit Ninhydrin                     | —                                  | —      |
|         | Kohleabsorbat 13,6 %            |                                   | —                                  | —      |
| 3       | <u>Salicylsäure</u>             |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 230 nm                        | 0,0042                             | 0,0042 |
|         | Kohleabsorbat 21,6 %            |                                   | 0,01                               | 0,011  |
|         | Kohleabsorbat 4,5 %             |                                   | 0,24                               | 0,24   |
| 4       | <u>Bernsteinsäure</u>           |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | —                                 | 0,0054                             | 0,0053 |
|         | Kohleabsorbat 22 %              |                                   | 0,023                              | 0,023  |
|         | Kohleabsorbat 9,1 %             |                                   | 0,04                               | 0,04   |
| 5       | <u>Maleinsäure</u>              |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 210 nm                        | 0,11                               | 0,11   |
|         | Kohleabsorbat 23 %              |                                   | 1,0                                | 1,0    |
|         | Kohleabsorbat 10,2 %            |                                   | 2,2                                | 2,15   |
| 6       | <u>Sorbinsäure</u>              |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 251 nm                        | 0                                  |        |
| 7       | <u>p-Chlorbenzoesäure</u>       |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 230 nm                        | 0,2                                | 0,2    |
| 8       | <u>Nikotinsäureamid</u>         |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 260 nm                        | 1,8                                | 1,8    |
| 9       | <u>p-Acetphenetidin</u>         |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz, pulv.         | bei 252 nm                        | 0,024                              | 0,023  |
|         | Kohleabsorbat 18,8 %            |                                   | 0,16                               | 0,16   |
|         | Kohleabsorbat 8,7 %             |                                   | 0,32                               | 0,32   |
| 10      | <u>Diäthylbarbitursäure</u>     |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 255 nm                        | 1,6                                | 1,6    |
|         | Kohleabsorbat 12,8 %            | in 0,5 n-NaOH                     | 2,8                                | 2,7    |
|         | Kohleabsorbat 6,7 %             |                                   | 5,1                                | 5,1    |
| 11      | <u>Phenyläthylbarbitursäure</u> |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 255 nm                        | 0,11                               | 0,10   |
|         | Kohleabsorbat 18,8 %            | in 0,5 n-NaOH                     | 0,27                               | 0,26   |
|         | Kohleabsorbat 8,1 %             |                                   | 0,43                               | 0,44   |
| 12      | <u>Ephedrin-HCl</u>             |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz, krist.        | nach Reaktion                     | 0,12                               | 0,12   |
|         | Kontrollsubstanz, pulv.         | mit Ninhydrin                     | 0,11                               | 0,12   |
|         | Kohleabsorbat 18 %              |                                   | 0,86                               | 0,85   |
| 13      | <u>Valin</u>                    |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | nach Reaktion                     | 0,013                              | 0,015  |
|         | Kohleabsorbat 16 %              | mit Ninhydrin                     | —                                  | —      |
|         | Kohleabsorbat 8,2 %             |                                   | —                                  | —      |
| 14      | <u>Salicylsäure</u>             | bei 230 nm                        |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                |                                   | 0,014                              | 0,014  |
| 14 T    | Kohleabsorbat 11,7 %            |                                   | 0,12                               | 0,12   |
|         | Kontrollsubstanz                |                                   | 0,006                              |        |
| 15      | <u>Sulfanilsäureamid</u>        |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 262 nm                        | 0,23                               | 0,24   |
| 15 T    | Kohleabsorbat 13,3 %            |                                   | 1,30                               | 1,35   |
|         | Kontrollsubstanz                |                                   | 0,08                               |        |
| 16      | <u>Rutin</u>                    |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 269 nm                        | 0,26                               | 0,26   |
| 16 T    | Kohleabsorbat 12 %              |                                   | 1,7                                | 1,72   |
|         | Kontrollsubstanz                |                                   | —                                  | —      |
| 17      | <u>Tyrosin</u>                  |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 240 nm                        | 0,5                                | 0,4    |
| 17 T    | Kohleabsorbat 13,6 %            |                                   | 0,21                               | 0,2    |
|         | Kontrollsubstanz                |                                   | —                                  | —      |
| 18      | <u>Testosteronpropionat</u>     |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 267 nm                        | 0,4                                | 0,4    |
| 19      | <u>β-Carotin</u>                |                                   |                                    |        |
|         | Kontrollsubstanz                | bei 451 nm                        | 5,3                                | 5,3    |
|         | Kohleabsorbat 10,1 %            |                                   | 16,4                               | 16,5   |

T = Tieftemperaturmarkierte Substanzen

#### 4. Anwendungsbeispiel einer markierten Substanz:

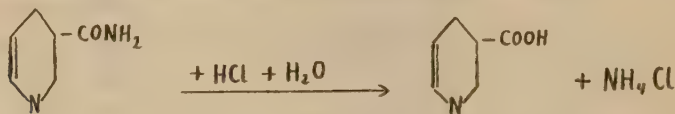
##### Bestimmung von Nikotinsäure:

Entsprechend dem vermuteten Reaktionsablauf bei der Tritiummarkierung nach Wilzbach ist ein Einbau des Tritiums an definierter Stelle im Molekül einer organischen Verbindung nicht zu erwarten. Tritiummarkierte Substanzen mit unbekannter Verteilung des radioaktiven Wasserstoffs über das Molekül lassen sich bei biologischen Versuchen nur dann zu quantitativ auswertbaren Beobachtungen einsetzen, wenn die tritiierten Molekeln im biochemischen System innerhalb des Versuches keine chemischen Veränderungen erleiden.

Es kommen demnach in erster Linie Versuche über die Verteilung, den Transport oder die Absorption bzw. Ausscheidung der markierten Verbindungen in Frage. Als analytische Hilfsmittel erlauben solche tritiummarkierten Verbindungen insbesondere im Rahmen der Isotopenverdünnungsanalyse mit geringem Aufwand die quantitative Bestimmung von Naturstoffen ohne vorherige vollständige Abtrennung der zu bestimmenden Substanz aus dem biologischen Substrat.

An einer Gehaltsbestimmung der Gesamtnikotinsäure in getrockneter Bierhefe soll dieses Verfahren erläutert werden. Während die Bestimmung der Nikotinsäure bzw. ihres Amids in pharmazeutischen Präparaten keine wesentlichen Schwierigkeiten bereitet, ist die Überprüfung des Wirkstoffgehaltes in Naturstoffen, z.B. im Rahmen lebensmittelchemischer Untersuchungen, keineswegs einfach.

Die radioaktive Nikotinsäure für diesen Versuch wurde aus dem kohleabsorbierten, tritiummarkierten Nikotinsäureamid (Substanz 8) durch Säurehydrolyse hergestellt.



Nikotinsäureamid

Nikotinsäure

Wie zu erwarten, hatte die Hydrolyse des Nikotinsäureamids (MG = 122,12) praktisch keine Änderung der spezifischen Aktivität beim Hydrolyseprodukt Nikotinsäure (MG = 123,11) zur Folge.

### Ausführung der Nikotinsäurebestimmung:

Eine Mischung von 1 g Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), 2 ml n-NaOH und 100 µg tritiummarkierter Nikotinsäure mit der spezifischen Aktivität von 9 uC/mg wurden in einem kalibrierten Zentrifugenglas eine Stunde auf dem Wasserbad unter Rückflußkühlung hydrolysiert.<sup>93)</sup>

Von dem mit Methanol auf 5 ml ergänzten Volumen des Hydrolysates wurden nach dem Absitzenlassen der unlöslichen Bestandteile 0,5 ml auf die Startlinie eines 15 cm breiten, mit Methanol gewaschenen Chromatographierpapiers aufgetragen. Zur Entwicklung des Chromatogramms diente ein Gemisch von Isobutanol 100 T, Salzsäure (25%) 20 T und Wasser 20 Teile<sup>94)</sup>.

Die genaue Lage der  $R_f$ -Zone der Nikotinsäure läßt sich entweder beim Aufnehmen der Aktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm oder durch Anfärben eines abgetrennten schmalen Probestreifens mit Bromcyandämpfen und Besprühen mit p-Aminobenzoessäurelösung (2%) ermitteln. Die letztere Methode wurde hier angewandt.

Der die abgetrennte Nikotinsäure enthaltene aus dem Chromatogramm herausgeschnittene Papierstreifen wurde mit etwa 5 ml Methanol extrahiert, das filtrierte Eluat auf ungefähr 2 ml eingengt.

In dieser Lösung konnte der Substanzgehalt an Nikotinsäure spektralphotometrisch bei 262 nm ermittelt werden. Der gemessenen Extinktion  $E_{1\text{ cm}} = 0,349$  entsprach eine Nikotinsäurekonzentration von 21 µg/ml.

Je 0,25 ml dieser Lösung in 3 Zählschälchen eingedunstet ergaben bei der Aktivitätsbestimmung im Methandurchflußzähler FH 407 eine mittlere Zählrate von 10 753 Imp./min. . Bei einer Zählausbeute von 43,5 % errechnet sich aus dieser Zählrate eine Aktivität von 44,4 nC pro ml Lösung bzw. 2,1 uC/mg Nikotinsäure.

Aus dem Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der zugesetzten markierten Nikotinsäure und des durch die inaktive Nikotinsäure der Hefe verdünnten Präparates errechnet sich unter Berücksichtigung der zugegebenen Substanzmenge Nikotinsäure (100 µg) der Gesamtnikotinsäuregehalt der Hefe wie folgt:

$$\frac{100 + x}{100} = \frac{9}{2,1}$$

$$x = 330 \text{ µg Nikotinsäure pro g Hefe .}$$

## D. E r g e b n i s s e :

### 1.) Erfahrungen mit der Markierungsapparatur.

Die für die Tritiummarkierung organischer Verbindungen nach Wilzbach neu konstruierte, übersichtliche und einfach zu handhabende Apparatur hat sich bei allen hier durchgeführten Markierungen gut bewährt.

Die Möglichkeit Tritium nach Bindung an Uran von gasförmigen Nebenprodukten der Markierungsreaktion zu reinigen gestattete, das gleiche Tritium zu mehreren Markierungen zu verwenden. Es ist jedoch zu beachten, daß bei der Markierungsreaktion neben dem im Molekül der organischen Verbindung durch Tritium ausgetauschten Wasserstoff im Verlauf strahleninduzierter Zersetzung der Substanzen noch weiterer inaktiver Wasserstoff in wechselnden Mengen frei wird. Dieser Wasserstoff wird vom Uran ebenso wie Tritium gebunden und beim Erhitzen des Hydrids auf  $425^{\circ}\text{C}$  wieder mit freigesetzt. Bei mehrfachen Anwenden der gleichen Tritiumcharge wird so das ursprünglich trägerfreie  $\text{T}_2$  verdünnt. Der im Probengefäß meßbare Druck entspricht dann nicht mehr dem wirklichen Tritiumpartialdruck.

Die Verdünnung des Tritiums wirkt sich wohl auf die absolute Höhe der spezifischen Aktivitäten der markierten Verbindungen aus, hat aber keinen Einfluß auf die relativen Erhöhungen der Markierungsraten bei den kohleadsorbierten Verbindungen im Vergleich zu ihren unter gleichen Bedingungen mitmarkierten Kontrollsubstanzen.

### 2.) Ergebnisse der Aktivitätsmessungen:

In Tabelle 10, Spalte c sind die spezifischen Aktivitäten aller markierten Verbindungen nach chromatographischer Reinigung zusammengestellt. Die Markierungsraten der kohleadsorbierten Verbindungen wurden mit denen der jeweiligen Kontrollsubstanzen in Beziehung gesetzt; die Zahlen in Spalte d der Tabelle geben an, um welchen Faktor die spezifischen Aktivitäten der Kohlepräparate sich gegenüber den Bezugssubstanzen erhöht haben.

Die absolute Höhe der spezifischen Aktivitäten beim Markieren der verschiedenen Substanzen ist stark unterschiedlich. Dies kann nur zum Teil durch die verschiedenen Markierungsbedingungen der einzelnen Probengruppen erklärt werden. Zum anderen Teil zeigt sich hier der starke Einfluß

der chemischen Natur der Substanzen auf die unter den jeweiligen Bedingungen erreichbaren Markierungsraten.

#### Aktivitätserhöhungen bei Zimmertemperatur markierter Substanzen:

Wie die Zahlenwerte der Spalten c und d in Tabelle 10 erkennen lassen, waren nach dem Zerkleinern der relativ großen Kristalle des p-Acetphenetidins (Nr.9) und des Ephedrins (Nr.12) durch Zerreiben zu einem möglichst feinen Pulver mit einer mindestens um den Faktor 10 vergrößerten Oberfläche keine erhöhten Markierungsraten festzustellen.

Bei der Mehrzahl der kohleadsorbierten Substanzen zeigten sich jedoch deutlich höhere spezifische Aktivitäten im Vergleich mit den Kontrollsubstanzen. In den meisten Fällen erhöhten sich die Markierungsraten nur um Faktoren, die unter 10 lagen. Auffallend war, daß bei schwach tritierten Substanzen die relative Erhöhung der spezifischen Aktivitäten der Kohlepräparate besonders deutlich war, wie z.B. bei der Bernsteinsäure (Substanz Nr. 4), Salizylsäure (Substanz Nr. 3) und dem p-Acetphenetidin (Substanz Nr. 9).

Darüberhinaus ist deutlich erkennbar, daß die Konzentration der adsorbierten Verbindung auf der Kohle von ausschlaggebender Bedeutung ist. Bei Salizylsäure (Substanz Nr. 3), Maleinsäure (Substanz Nr. 5), p-Acetphenetidin (Substanz Nr. 9) und Ephedrin (Substanz Nr. 12) wurden spezifische Aktivitäten erhalten, die gegenüber den unter gleichen Bedingungen mitmarkierten Kontrollsubstanzen um den Faktor 13 - 57 erhöht waren. Diese Aktivitätssteigerungen wurden jeweils bei den geringer beladenen Kohlepräparaten gemessen.

#### Aktivitätserhöhungen bei Tieftemperaturmarkierung:

Erhöhungen um den 20 - 48 fachen Aktivitätswert ergaben sich ebenfalls bei den Kohleadsorbaten der Salizylsäure (Substanz Nr. 14), dem Sulfanilsäureamid (Substanz Nr. 15) und dem Rutin (Substanz Nr. 16), wenn diese bei tiefen Temperaturen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) markiert wurden. Durch zusätzliche Adsorption des Tritiums an die mit diesen Substanzen beladene Aktivkohle bei Kühlung mit flüssigem Stickstoff ließen sich die bei Zimmertemperatur schon erhaltenen Aktivitätssteigerungen um den Faktor 5,6 - 8,5 weiterhin beträchtlich erhöhen.

Die bei tiefen Temperaturen mitbehandelten Kontrollsub-

Tabelle 10, Ergebnisse der Markierungsversuche

| Nr   | b<br>Präparate               | c<br>Spezif.<br>Aktivit.<br>µG/mg | d<br>Aktivit.<br>erhöht um<br>Faktor: | e<br>Radioakt.<br>Verunreinig.<br>% |
|------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 1    | <u>Cholesterin</u>           |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,82                              | 1                                     | 83 %                                |
|      | Kohleadsorbat 15,4 %         | 1,4                               | 1,7                                   | 50 %                                |
|      | Kohleadsorbat 8,4 %          | 3,1                               | 3,8                                   | 41 %                                |
| 2    | <u>Leucin</u>                |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 21                                | 1                                     | 17 %                                |
|      | Kohleadsorbat 16,6 %         | --                                | --                                    | 96 %                                |
|      | Kohleadsorbat 13,6 %         | --                                | --                                    | 100 %                               |
|      | Kohleadsorbat 5,7 %          | --                                | --                                    | 100 %                               |
| 3    | <u>Salicylsäure</u>          |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,0042                            | 1                                     | 86 %                                |
|      | Kohleadsorbat 21,6 %         | 0,011                             | 2,6                                   | 45 %                                |
|      | Kohleadsorbat 4,5 %          | 0,24                              | 57                                    | 15 %                                |
| 4    | <u>Bernsteinsäure</u>        |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,0054                            | 1                                     | 61 %                                |
|      | Kohleadsorbat 22 %           | 0,023                             | 4,25                                  | 59 %                                |
|      | Kohleadsorbat 3,1 %          | 0,04                              | 7,4                                   | 37 %                                |
| 5    | <u>Maleinsäure</u>           |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,11                              | 1                                     | 73 %                                |
|      | Kohleadsorbat 23 %           | 1,0                               | 9,1                                   | 33 %                                |
|      | Kohleadsorbat 10,2 %         | 2,2                               | 20                                    | 19 %                                |
| 6    | <u>Sorbinsäure</u>           |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0                                 | 0                                     | 100 %                               |
|      | Kohleadsorbat 8,4 %          | 0                                 | 0                                     | 100 %                               |
| 7    | <u>p-Chlorbenzoesäure</u>    |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,2                               | 1                                     | 56 %                                |
|      | Kohleadsorbat 14,2 %         | 0,84                              | 4,2                                   | 26 %                                |
| 8    | <u>Nikotinsäureamid</u>      |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 1,8                               | 1                                     | 68 %                                |
|      | Kohleadsorbat 13,4 %         | 9,0                               | 5                                     | 49 %                                |
| 9    | <u>p-Acetphenetidin</u>      |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz, krist.     | 0,024                             | 1                                     | 81 %                                |
|      | Kontrollsubstanz, pulv.      | 0,025                             | 1,02                                  | 80 %                                |
|      | Kohleadsorbat 18,8 %         | 0,16                              | 6,65                                  | 79 %                                |
|      | Kohleadsorbat 8,7 %          | 0,31                              | 13                                    | 61 %                                |
| 10   | <u>Diaethylbarbiturs.</u>    |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 1,6                               | 1                                     | 75 %                                |
|      | Kohleadsorbat 12,8 %         | 2,7                               | 1,7                                   | 45 %                                |
|      | Kohleadsorbat 6,7 %          | 5,1                               | 3                                     | 44 %                                |
| 11   | <u>Phenyläthylbarbiturs.</u> |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,1                               | 1                                     | 77 %                                |
|      | Kohleadsorbat 18,8 %         | 0,26                              | 2,6                                   | 62 %                                |
|      | Kohleadsorbat 8,1 %          | 0,44                              | 4,4                                   | 38 %                                |
| 12   | <u>Ephedrin-HCl</u>          |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz, krist.     | 0,12                              | 1                                     | 90 %                                |
|      | Kontrollsubstanz, pulv.      | 0,12                              | 1                                     | 86 %                                |
|      | Kohleadsorbat 18 %           | 0,85                              | 7                                     | 69 %                                |
|      | Kohleadsorbat 8,1 %          | 1,9                               | 15,4                                  | 30 %                                |
| 13   | <u>Valin</u>                 |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,014                             | 1                                     | 26 %                                |
|      | Kohleadsorbat 16 %           | --                                | --                                    | 100 %                               |
|      | Kohleadsorbat 8,2 %          | --                                | --                                    | 100 %                               |
| 14   | <u>Salicylsäure</u>          |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,014                             | 1                                     | 82 %                                |
|      | Kohleadsorbat 11,7 %         | 0,12                              | 8,5                                   | 58 %                                |
| 14 T | Kontrollsubstanz             | 0,006                             |                                       |                                     |
|      | Kohleadsorbat 11,7 %         | 0,68                              | 48,5                                  | 35 %                                |
| 15   | <u>Sulfanilsäureamid</u>     |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,24                              | 1                                     | 55 %                                |
|      | Kohleadsorbat 13,3 %         | 1,35                              | 5,6                                   | 45 %                                |
| 15 T | Kontrollsubstanz             | 0,08                              |                                       |                                     |
|      | Kohleadsorbat 13,3 %         | 9,82                              | 41                                    | 17 %                                |
| 16   | <u>Rutin</u>                 |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,26                              | 1                                     | 76 %                                |
|      | Kohleadsorbat 12 %           | 1,72                              | 6,6                                   | 27 %                                |
| 16 T | Kontrollsubstanz             |                                   |                                       |                                     |
|      | Kohleadsorbat 12 %           | 5,3                               | 20                                    | 23 %                                |
| 17   | <u>Tyrosin</u>               |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,4                               | 1                                     | 74 %                                |
|      | Kohleadsorbat 13,6 %         | 0,2                               | 0,5                                   | 88 %                                |
| 17 T | Kontrollsubstanz             | --                                |                                       |                                     |
|      | Kohleadsorbat 13,6 %         | --                                |                                       | 98 %                                |
| 18   | <u>Testosteronpropionat</u>  |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 0,4                               | 1                                     | 91 %                                |
|      | Kohleadsorbat 10,6 %         | 1,4                               | 5,6                                   | 70 %                                |
| 19   | <u>ß-Carotin</u>             |                                   |                                       |                                     |
|      | Kontrollsubstanz             | 5,3                               | 1                                     | 88 %                                |
|      | Kohleadsorbat 10,1 %         | 16,5                              | 3,1                                   | 65 %                                |

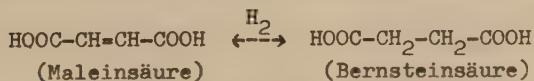
T = Tieftemperaturmarkierte Substanzen

stanzen wurden nur sehr wenig markiert. Diese Erscheinung dürfte als Beweis für eine weitgehende Adsorption des Tritiums an das Kohlepräparat bei Abkühlung auf  $-196^{\circ}\text{C}$  zu werten sein. Zum echten Vergleich mit den Markierungsergebnissen der Kohlepräparate eigneten sich diese Kontrollsubstanzen nicht. Die spezifischen Aktivitäten der bei tiefen Temperaturen mit Tritium behandelten Kohlebeladungen wurden deshalb mit den Aktivitätswerten der bei Zimmertemperatur markierten Kontrollpräparate in Beziehung gesetzt.

Markierung von Substanzen mit Doppelbindungen:

Werden Substanzen mit Kohlenstoff-Doppelbindungen tritiummarkiert, so sind stets unerwünschte Hydrierungsprodukte zu erwarten.

Bei der Behandlung der Äthylendicarbonsäure Maleinsäure mit Tritium nach Wilzbach ergab sich, daß nur in der



Kontrollsubstanz radioaktive Bernsteinsäure als Hydrierungsprodukt chromatographisch nachzuweisen war in den Extrakten der Kohlepräparate dagegen nicht auftrat. Das Laufmittel zur Chromatographie der markierten, ungereinigten Maleinsäure erlaubte neben einem Nachweis der Bernsteinsäure

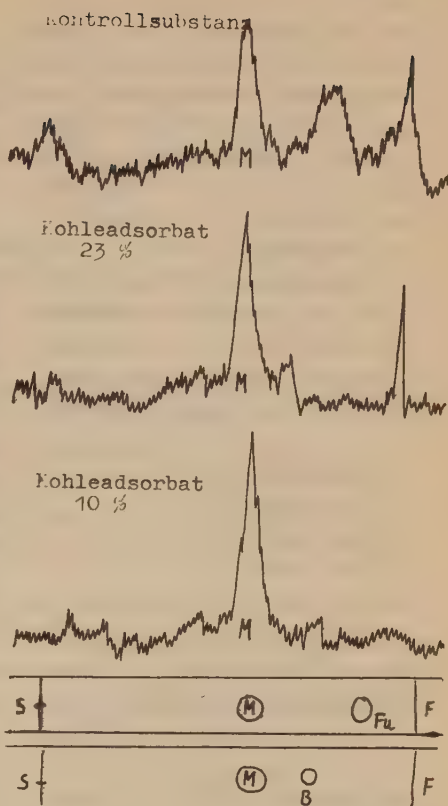
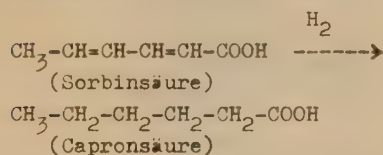


Abbildung 8, Maleinsäure (%)

Bei den Kohlepräparaten trat weder Bernsteinsäure (B) noch Fumarsäure (Fu) als radioaktive Verunreinigung auf.

auch eine Abtrennung der isomeren trans-Form der Maleinsäure, Fumarsäure. Wie die erhaltenen Radiopapierchromatogramme zeigen, kam es weder bei der Markierung noch beim schonenden Aufarbeiten der Proben zu einer Umlagerung der Maleinsäure in Fumarsäure (s. Abbildung 8).

Die konjugierten Doppelbindungen der Sorbinsäure wurden im Gegensatz zu der einfachen Doppelbindung der Maleinsäure praktisch vollständig hydriert.



Tritiummarkierte Sorbinsäure war weder in der Kontrollsubstanz noch im Kohleextrakt bei chromatographischer Auftrennung nachzuweisen. Bei beiden Präparaten erschien dagegen Capronsäure als Hydrierungsprodukt der Sorbinsäure neben anderen Zersetzungsprodukten im Radiopapierchromatogramm (s. Abb. 9).

Auf Grund dieses Ergebnisses mußten beim  $\beta$ -Carotin mit seinen zahlreichen konjugierten Doppelbindungen ebenfalls vorwiegend Hydrierungsprodukte erwartet werden. Das traf auch für die Kontrollsubstanz weitgehend zu. Im Kohleextrakt zeigten sich dagegen nach dem Auftrennen auf

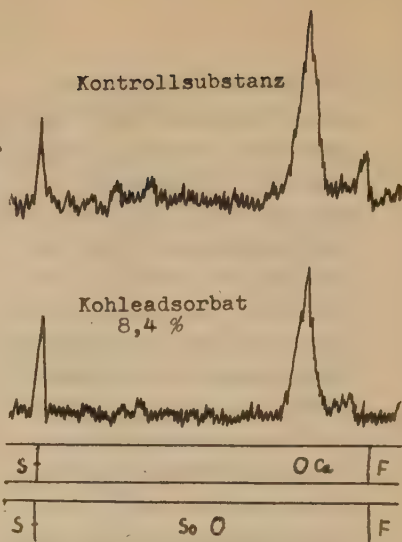


Abbildung 9, Sorbinsäure (So)  
Bei der Markierung war nur das Hydrierungsprodukt Capronsäure (Ca) nachweisbar.

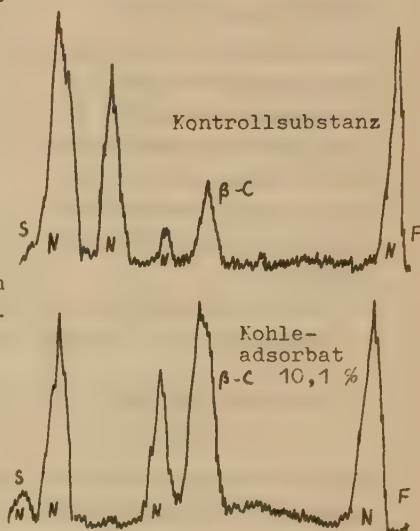
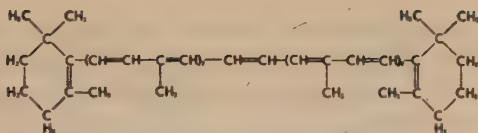


Abbildung 10,  $\beta$ -Carotin ( $\beta$ -C.)  
Im Kohlepräparat waren geringere Anteile an radioaktiven Nebenprodukten (N) nachweisbar.



$\beta$ -Carotin  $C_{40}H_{56}$

einer Dünnschichtplatte (Kieselgel G) wesentlich weniger Verunreinigungen, die als Hydrierungsprodukte des  $\beta$ -Carotins angesehen werden konnten (s. Abbildung 10).

#### Markierung von Aminosäuren:

Abweichende Ergebnisse waren nach Markierung der Aminosäuren Leucin (Präparat Nr. 2), Valin (Präparat Nr. 13) und Tyrosin (Präparat Nr. 17) festzustellen. Während bei den Kontrollsubstanzen diese Aminosäuren in unterschiedlicher Höhe markiert wurden, ließen sich in den Kohleextrakten des Leucins und Valins (s. Abb. 11) die markierten Aminosäuren überhaupt nicht nachweisen, sondern nur radioaktive Nebenprodukte. Das bei Zimmertemperatur mit Tritium behandelte Kohleadsorbat des Tyrosins ließ noch einen geringen Anteil an  $^3H$ -markierten Tyrosin auf dem Radiopapierchromatogramm erkennen. Bei Tieftemperaturmarkierung des gleichen Kohlepräparates war der Anteil an radioaktivem Tyrosin praktisch Null.

Diese Ergebnisse lassen sich nur unbefriedigend deuten. Wenn man annimmt, daß die entsprechenden Aminosäuren in den Kohleextrakten bei der Aufbereitung der Präparate chemisch zersetzt wurden, so müßte auch die Kontrollsubstanz in gleicher Weise zerfallen sein, da

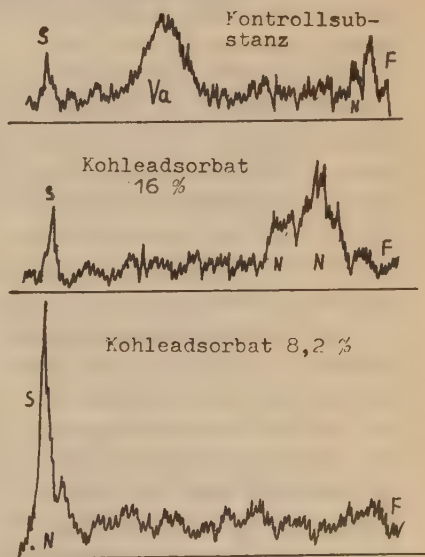


Abbildung 11, Valin (Va)  
Tritiummarkiertes Valin war nur in der Kontrollsubstanz nachweisbar.

sie stets gleich behandelt wurde. Im übrigen ließ sich nach chromatographischer Auftrennung des Kohleextraktes von Valin die nichtmarkierte Aminosäure mit Ninhydrin noch deutlich nachweisen.

### 3.) Verunreinigungen mit radioaktiven Nebenprodukten:

Wie die in Spalte d der Tabelle 10 aufgeführten Angaben über die radioaktiven Verunreinigungen zeigen, liegt bei den Substanzen, die in ihren Kohleadsorbaten Steigerungen der spezifischen Aktivitäten ergaben, auch der Prozentsatz an unerwünschten radioaktiven Nebenprodukten niedriger, als bei ihren Kontrollsubstanzen.

Bisher waren höhere spezifische Aktivitäten nur bei Zufuhr äußerer Anregungsenergie erzielt worden. Dabei wurde fast immer eine beträchtliche Vermehrung der radioaktiven Verunreinigungen beobachtet. Bei der hier angewendeten Markierungstechnik konnte bei den erfolgreich tritierten Substanzen eine deutlich geringere

Verunreinigungsrate festgestellt werden. Besonders niedrige Anteile an radioaktiven Nebenprodukten wurden in den bei tiefen Temperaturen markierten Kohlepräparaten der Salizylsäure (Präparat Nr. 14), des Sulfanilsäureamids (Präparat Nr. 15) und des Rutins (Präparat Nr. 16) erhalten (s. Abbildungen 12 und 13).

Aus den Radiopapierchromatogrammen sind aber nicht nur quantitative Unterschiede in den radioaktiven Nebenprodukten ablesbar. Ebenso bemerkenswert ist auch, daß bei Markierung der Kontrollsubstanzen und Kohleadsorbate offenbar zum Teil ganz verschiedene Nebenprodukte, erkennbar an ihren verschiedenen

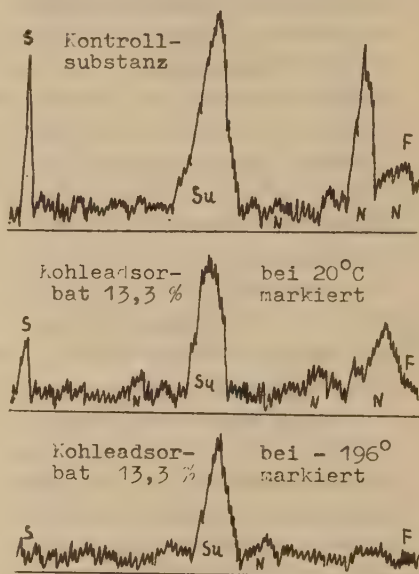


Abbildung 12, Sulfanilsäureamid (Su)

Die geringsten radioaktiven Verunreinigungen (N) zeigte das bei  $-196^{\circ}$  markierte Kohlepräparat.

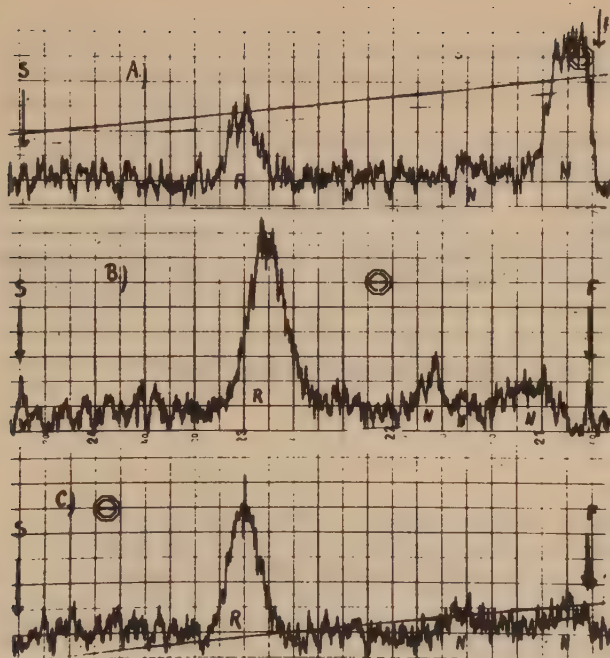


Abbildung 13, Rutin (R)

Aktivitätsverteilung der ungereinigten, aber vom labilen Tritium befreiten Substanzen auf Papierchromatogrammen. A) Kontrollsubstanz und B) Kohleadsorbat 12 % bei 20°C markiert, C) Kohleadsorbat 12 % bei -196°C markiert.

Die Kohlepräparate zeigen gegenüber der Kontrollsubstanz geringere Anteile an radioaktiven Verunreinigungen (N). Diese waren besonders niedrig beim Tieftemperaturversuch.

$R_f$ -Werten, gebildet wurden. Diese Tatsache ist besonders augenfällig bei den Chromatogrammen der Kontrollproben und Kohleextrakte von Maleinsäure (Abb. 8), Diaethylbarbitursäure (Abb. 5), Rutin (Abb. 13) und  $\beta$ -Carotin (Abb. 10).

#### 4.) Tritiumverteilung beim Rutin:

Nach dem vermuteten Reaktionsablauf bei dem Gasaustauschverfahren nach Wilzbach ist ein Einbau des Tritiums an definierter Stelle im Molekül einer organischen Verbindung nicht zu erwarten. Möglicherweise werden aber auf Grund des räumlichen Baues der Verbindungen oder anderer noch nicht erkannter Gegebenheiten besondere Zentren eines Moleküls bei der Markierung bevorzugt. Z.B. konnte Simon<sup>95)</sup> nach-

weisen, daß bei nach Wilzbach markierter Glukose überraschenderweise mehr als 90 % des aufgenommenen Tritiums am  $C_3$ -Atom gebunden worden war. Bei Markierung von Fruktose wurde neben dem  $C_3$ -Atom das  $C_5$ - und  $C_1$ -Atom besonders bevorzugt. Bisher liegen über die Tritium-Verteilung innerhalb markierter Moleküle nur wenige Arbeiten vor<sup>67,73,75,95</sup>.

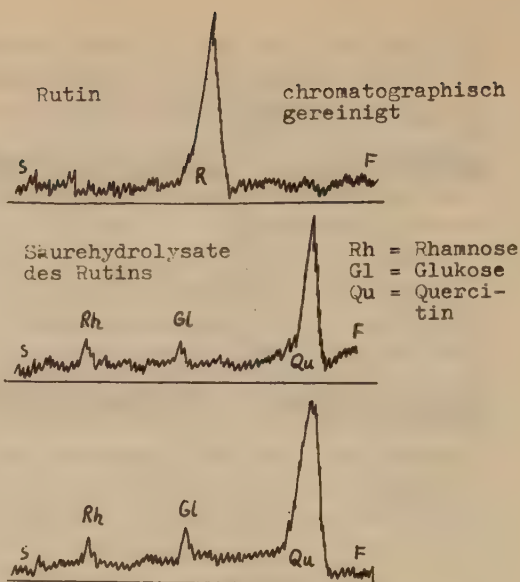
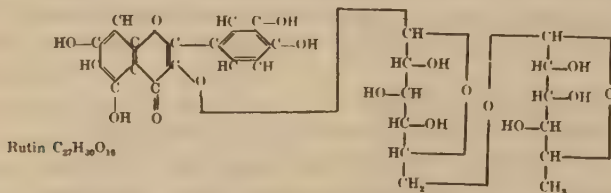


Abbildung 14. Verteilung von Tritium über das Rutin-Molekül. Das Aglykon Quercetin wurde wesentlich stärker markiert als der Zuckeranteil

Bekannt ist, daß bei Zuckern und Polyalkoholen unter gleichen Markierungsbedingungen gegenüber anderen Substanzklassen besonders hohe Markierungsraten erzielt werden<sup>62</sup>).

Inwieweit diese Beobachtung auch für den Zuckeranteil von Glykosiden gültig ist, wurde hier an dem im Rahmen dieser Arbeit markierten Rutin untersucht. Rutin (Vitamin P) ist das 6-( $\beta$ ,L-Rhamnosido)-D-Glukose-Glykosid des Quercitins.



Wie bei allen Glykosiden läßt sich der Zuckeranteil abtrennen:

- 1.) fermentativ, durch Behandeln mit den entsprechenden Glykosidasen,
- 2.) durch Behandeln mit verdünnten Säuren.

Abbildung 14 zeigt die Radioaktivitätsverteilung auf Papierchromatogrammen von durch Säurebehandlung aufgespaltenem Rutin.

Chromatographisch von allen radioaktiven Verunreinigungen befreites Rutin (Abb. 14 A) wurde mit Schwefelsäure (10%) 30 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt<sup>95)</sup>. Wie aus dem Radio-papierchromatogramm der alkalischen Lösung des Hydrolysates (Abb. 14 B) ersichtlich, wurde das Aglykon Quercitin wesentlich stärker mit Tritium markiert, als die Zucker. Diese unerwartete Beobachtung galt sowohl für das auf Kohle markierte Rutin, als auch für die Kontrollsubstanz.

### E. D i s k u s s i o n :

Wie im vorhergehenden Abschnitt ausführlich gezeigt wurde, erhält man beim Tritieren kohleadsorbierter Verbindungen im allgemeinen höhere spezifische Aktivitäten sowie geringere Anteile an radioaktiven Verunreinigungen, als beim Behandeln kristalliner oder auch gepulverter Kontrollsubstanzen.

Diesem günstigen Effekt steht der Aufwand beim Herstellen der Präparate, Vorbereiten zur Markierung und der weiteren Aufarbeitung gegenüber. Man wird also je nach Substanz Vor- und Nachteile abzuwägen haben.

Da bei biochemischen Untersuchungen der Nachweis der markierten Substanzen oft von deren ausreichend hohen spezifischen Aktivitäten abhängig ist, wird sich in vielen Fällen dieser Aufwand lohnen. Außerdem ist dieses Verfahren gerade für nicht- oder schwersynthetisierbare Naturstoffe geeignet, die manchmal nur in kleinen Mengen verfügbar sind und nach dem Markieren keine umfangreichen Reinigungsoperationen zulassen.

#### 1.) Markierung von Substanzen mit vergrößerter Oberfläche:

Um höhere spezifische Aktivitäten mit dem Wilzbach-Verfahren zu erzielen, wurden Substanzen mit vergrößerter Oberfläche mit Tritiumgas behandelt.

Bei kristallinen Verbindungen läßt sich eine Oberflächenvergrößerung schon durch mechanisches Zerkleinern erreichen. In der folgenden Tabelle sind die erzielbaren Oberflächen

und die Faktoren der Oberflächenvergrößerung von Salizylsäure gegenübergestellt, die man erwarten kann, wenn die ziemlich großen Kristallnadeln dieser Verbindung mechanisch zerkleinert, bzw. aus einer Lösung an Aktivkohle adsorbiert werden.

| <u>Salizylsäure:</u>                                                 | Oberfläche<br>von 100 mg | Faktor der<br>Oberflächen-<br>vergrößerung |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|
| Kristallnadeln ( $D=1,44$ , Länge 1 mm,<br>Höhe und Breite 0,2 mm)   | 0,0015 m <sup>2</sup>    | 1                                          |
| Kristalle mechanisch zerkleinert,<br>(etwa kugelförmig, $r=0,01$ mm) | 0,021 m <sup>2</sup>     | 14                                         |
| Nach Adsorption an 1 g Aktiv-<br>kohle                               | 100-1000 m <sup>2</sup>  | ca. $10^5$ - $10^6$                        |

Bei Adsorption an Aktivkohle ergibt sich demnach eine beträchtliche Oberflächenvergrößerung. Wird die wirksame Oberfläche von 100 - 1000 m<sup>2</sup> pro Gramm Kohle<sup>12)</sup> gleichmäßig mit Substanz belegt, so bildet sich eine Schicht von 0,07 bis 0,7 nm Dicke. Durch eine derartige Schicht werden die etwa 3 - 10 nm weiten wirksamen Kapillargänge der Kohle noch nicht verstopft. Tritium kann in den verbleibenden Räumen diffundieren und wird bei Zimmertemperatur selbst nicht merklich adsorbiert.

Das Vergrößern der Oberfläche durch Zerreiben fester Substanzen zu einem feinen Pulver brachte noch keine höheren Markierungsraten. Gleiche Ergebnisse hatten auch Rosenblum und Meriwether<sup>10)</sup> erhalten. Eine etwa um den Faktor 100 vergrößerte Substanzoberfläche, die bei sorgfältigem Pulverisieren erreicht werden kann, hatte auch bei diesen Autoren noch keinen merklichen Einfluß auf die Höhe der spezifischen Aktivitäten.

Dagegen können die höheren Markierungsraten bei den kohleadsorbierten Verbindungen auf die Wirkung der vergrößerten Oberfläche zurückgeführt werden. Die beobachteten Aktivitätssteigerungen blieben jedoch weit hinter den Faktoren der Oberflächenvergrößerung zurück.

Offenbar kommt es doch nicht zu gleichmäßig starker Belegung der Kapillarenwände mit der adsorbierten Substanz. Möglicherweise werden einige der Kapillaren bzw. Kapillarenden durch die aufgenommene Substanz verstopft, so daß Tritium nur durch einen Teil des Kapillarsystems diffundieren kann. Die erwartete Wirkung der vergrößerten Sub-

stanzoberfläche auf den Markierungseffekt wird durch solche Erscheinungen stark gedämpft.

Auch bei der Adsorption von Gasen an aktive Kohle nimmt man Kapillarkondensationen an, bei denen die Gase in den feinen Kapillarenden kondensieren und diese dabei vollständig ausfüllen<sup>76)</sup>.

Während der Herstellung der Kohleadsorbate wurden auf der Kohle nach dem Abfiltrieren der Restsubstanzlösung zuweilen kristalline Ausscheidungen beobachtet. Dieser Rückstand auf der Kohle ließ sich durch Nachwaschen mit reinem Lösungsmittel wieder beseitigen. Inwieweit dabei kristalline Substanzabscheidungen im Innern der Kohle miterfaßt wurden, war nicht zu kontrollieren. Ein teilweises Verstopfen des Kapillarsystems durch beim Vertreiben des Lösungsmittels auskristallisierende Substanz kann insbesondere bei höheren Kohlebeladungen demnach als möglich angenommen werden. Die Zunahme der spezifischen Aktivitäten beim Übergang zu geringeren Kohlebeladungen mit verminderten Verstopfungsmöglichkeiten deuten ebenfalls in Richtung dieser Erklärung.

Neben der Wirkung der vergrößerten Oberfläche müssen noch weitere Faktoren angenommen werden, die die Höhe der Markierungsraten beeinflussen. Von solchen zum Teil noch gar nicht erkannten Parametern können auf die Markierungsreaktion sowohl günstige, als auch hemmende Wirkungen ausgehen.

Betrachtet man die Berichte über Markierungsversuche in der Literatur der letzten Jahre<sup>72)</sup>, so muß als ein weiterer markierungsbestimmender Faktor das Verhältnis des eingesetzten trägerfreien Tritiums zu der Gesamtmasse aller anderen im Reaktionsgefäß enthaltenen Stoffe beachtet werden. Zu den letzteren gehören neben der zu markierenden Substanz selbst z.B. alle gasförmigen Zersetzungsprodukte der Substanz, die bei Verwendung der gleichen Tritiumcharge zu mehreren Versuchen das Tritium verdünnen. Auch wenn das Tritium nach jeder Markierung an Uran gebunden wird, so daß alle gasförmigen Folgeprodukte der Markierungsreaktion durch Abpumpen entfernt werden können, wird bei dieser Reinigung Wasserstoff nicht miterfaßt, da dieser sich ebenso wie das Tritium als Hydrid an Uran binden kann.

Neben der zu markierenden Substanz und Wasserstoff muß bei den Versuchen dieser Arbeit in erster Linie die Kohle der kohleadsorbierten Präparate als wesentlicher Massenanteil im Reaktionsgefäß angesehen werden. Während einerseits der Substanz durch dieses Adsorbens die Möglichkeit geboten wurde, sich über eine große Fläche in dünner Schicht zu verteilen, kann die Kohle andererseits die  $\beta$ -Energie, die beim Zerfall der Tritiumkerne frei wird, teilweise in ihr Graphitgitter ableiten. Dieser Energieanteil steht dann zur Vermittlung der Markierungsreaktion nicht mehr zur Verfügung.

Die der erheblichen Oberflächenvergrößerung bei Adsorption an Aktivkohle nicht entsprechende oft nur geringe Steigerung der spezifischen Aktivitäten kann auch als Ergebnis des Zusammenwirkens von Faktoren mit gegensätzlichem Einfluß gedeutet werden. Möglicherweise spielen bei der Markierung kohleadsorbierter Substanzen auch katalytische Effekte der Aktivkohle eine Rolle, wobei die ablaufenden chemischen Reaktionen entweder im Sinne einer höheren Markierung oder einer stärkeren Zersetzung der Substanz gesteuert werden können.

Bei der Mehrzahl der im Rahmen dieser Arbeit markierten Verbindungen überwogen die markierungsbegünstigenden Faktoren. Die spezifischen Aktivitäten der kohleadsorbierten Verbindungen lagen deutlich höher als die der gleichzeitig mitmarkierten Kontrollsubstanzen. Im Falle der Aminosäuren Leucin, Valin und Tyrosin waren die markierungshemmenden Einflüsse stärker, so daß die Kohlepräparate trotz ihrer großen Oberfläche weniger markiert wurden als die Kontrollsubstanzen.

## 2.) Markierung bei tiefen Temperaturen:

Bei Zimmertemperatur und dem niedrigen Druck im Probengefäß wird Tritium von aktiver Kohle nicht adsorbiert. Erst nach Abkühlung der Kohle, bzw. Kohlepräparate auf Temperaturen um  $-200^{\circ}\text{C}$  kommt es zu einer praktisch quantitativen Aufnahme des radioaktiven Wasserstoffs<sup>13,14)</sup>. Dabei erhöht sich die Tritiummenge, die mit der Oberfläche der kohleadsorbierten Substanz in Berührung kommt. Das muß eine weitere Steigerung der spezifischen Aktivitäten bei

der Markierung zur Folge haben.

Die Aufnahme des Tritiums an die Kohlebeladungen wird einmal durch die sehr geringen Markierungsraten der mitbehandelten Kontrollsubstanzen (s. Tabelle 10, Spalte a) bewiesen. Zum anderen ist das Absinken des bei 20°C eingestellten Ausgangsdruckes auf Werte unter 1 Torr nach Kühlung durch flüssigen Stickstoff nicht durch Änderung der Temperatur allein zu erklären. Abkühlung von 20°C auf -196°C vermindert den Druck eines Gases nur auf ein Viertel seines Ausgangswertes. Bei einem Ausgangsdruck von ca. 400 Torr (s. Tabelle 4) müßten nach dem Kühlen des Gasbehälters mit flüssigem Stickstoff noch 100 Torr zu messen sein. Ein darüberhinausgehender Druckabfall kann nur durch Adsorption des Gases an die Kohle erklärt werden.

Der Kernzerfall des Tritiums wird durch Abkühlen auf -196°C nicht beeinflusst. Jedoch wird der Vorteil der Tritiumkonzentrierung im Kohlepräparat zum Teil durch die stark verminderte chemische Reaktionsgeschwindigkeit bei dieser tiefen Temperatur wieder aufgehoben. Nach dem Ergebnis der Markierungsversuche bei tiefen Temperaturen ist anzunehmen, daß ein beträchtlicher Teil des Tritiumeinbaues nicht zustande kommt, weil die für das Eingehen einer chemischen Bindung erforderliche Anregung der Moleküle durch die  $\beta$ -Energie der Tritiumstrahlung zu kurzzeitig wieder abklingt.

### 3.) Verunreinigung durch radioaktive Nebenprodukte:

Neben einem erwünschten Austausch eines Wasserstoffatoms gegen ein Tritiumatom ereignen sich beim Tritierungsprozeß zahlreiche weitere Umsetzungen, die bei Neukombinationen von Molekülbruchstücken zu tritierten und inaktiven Nebenprodukten führen<sup>60)</sup>.

Bei erhöhten Austauschraten ist mit einem entsprechendem Ansteigen solcher Verunreinigungen zu rechnen. Steigerung der spezifischen Aktivitäten unter Energiezufuhr von außen, z.B. durch Einwirkung von elektrischen Entladungen, hatte in der Regel eine stärkere Zersetzung der Ausgangssubstanz und ein vermehrtes Auftreten von radioaktiven Verunreinigungen zur Folge<sup>6-9)</sup>.

Zum Unterschied dazu wurden - wie aus den hier abgebildeten Aktivitätsverteilungskurven bzw. den Zahlenwerten in Tabelle 10, Spalte e zu ersehen ist - bei den kohle-adsorbierten Verbindungen mit höheren spezifischen Aktivitäten geringere Prozentsätze an radioaktiven Nebenprodukten beobachtet als bei den gleichzeitig mitmarkierten Kontrollsubstanzen.

Diese Tatsache erscheint umso erstaunlicher, da auch bei Aktivkohlen, die vor dem Gebrauch mit verschiedenen Extraktionsmitteln gewaschen wurden, stets noch mit Resten von organischen Verbindungen aus den Kohleausgangsprodukten zu rechnen ist. Diese werden bei Behandlung mit Tritium nach Wilzbach ebenfalls markiert und können neben der eigentlich zu tritierenden Verbindung im Kohleextrakt radioaktive Verunreinigungen vortäuschen.

Man könnte die geringeren Anteile an radioaktiven Verunreinigungen durch das Verbleiben von Nebenprodukten auf der Kohle erklären, zumal es auch bei kontinuierlicher Extraktion in keinem Fall gelang, die an die Kohle adsorbierte Substanz wieder restlos zu eluieren.

Ein Zurückbleiben höhermolekularer Folgeprodukte der adsorbierten Substanz auf der Kohle wäre zwar denkbar, erfahrungsgemäß besteht jedoch der überwiegende Anteil der Nebenprodukte strahlenschemischer Reaktionen aus niedermolekularen Bruchstücken der Ausgangssubstanz. Niedermolekulare Verbindungen werden aber im allgemeinen von Aktivkohle schlechter adsorbiert und sind entsprechend leichter und vollständiger eluierbar als die Ausgangsverbindung<sup>99,100</sup>). Sie müßten demnach auf dem Papierchromatogramm der unge- reinigten Kohleextrakte erscheinen, soweit es sich nicht um leichtflüchtige Verbindungen handelt.

Kohleextrakt und mittritierte Kontrollsubstanz erfuhren zur Entfernung des labil gebundenen Tritiums die gleiche Behandlung. Die Unterschiede in den Chromatogrammen sind deshalb auch nicht Folgen des Verbleibens von leicht austauschbarem Tritium oder (beim Eindampfen der Lösungen) flüchtigen Nebenprodukten bei der markierten Vergleichs- substanz.

Die unter den gleichen Flutionsbedingungen gewonnenen Kohleextrakte der bei 20°C und bei -196°C tritierten kohle-

adsorbierten Verbindungen Salizylsäure, Sulfanilsäureamid und Rutin zeigen ein deutliches Absinken der Verunreinigungen bei den Tieftemperaturversuchen. Dieses Resultat läßt sich keinesfalls so diskutieren, daß ein Absinken der Verunreinigungen im Eluat nur durch deren Verbleiben auf der Kohle vorgetäuscht wird. Wenn bei dem Tieftemperaturversuch Verunreinigungen in gleicher Menge wie bei der Tritierung der kohleadsorbierten Verbindung bei 20°C entstanden wären, müßten diese genauso im Eluat nachweisbar sein. Mutatis Mutandis gilt dies ebenfalls für das unterschiedliche Ausmaß an Verunreinigungen bei den beiden tritierten Kohleadsorbaten der Maleinsäure.

Das Absinken der Verunreinigungen bei den kohleadsorbierten Verbindungen läßt sich möglicherweise so deuten, daß die durch Absorption der  $\beta$ -Energie des Tritiums hochangeregten Moleküle, die auf der Aktivkohle adsorbiert sind, ihre überschüssige Energie an das Graphitgitter der Kohle abgeben, so daß sie nicht für einen Molekülzerfall wirksam werden kann.

Eine gewisse Parallelität zu diesen Ergebnissen findet man in Arbeiten von Dose und Rajewsky<sup>15)</sup>. Diese Autoren beobachteten eine reduzierte Strahlenempfindlichkeit bei Aminosäuren, wenn diese - an Ionenaustauscher adsorbiert - mit Gammastrahlen oder Röntgenstrahlen behandelt wurden. Übereinstimmend damit konnten Fletcher und Okado<sup>16)</sup> eine verminderte Inaktivierung von adsorbierter Desoxyribonuklease nachweisen. Ausmaß der Adsorption und Strahlenschutzwirkung verliefen proportional.

## F. Zusammenfassung:

Beim Einsatz  $^3\text{H}$ -markierter Verbindungen zur Aufklärung biochemischer Vorgänge oder bei der analytischen Bestimmung von Naturstoffen hängt der Erfolg von einer ausreichend hohen "spezifischen Aktivität" der radioaktiven Substanz ab.

In dieser Arbeit wurden nach dem Verfahren von Wilzbach in einer neu konstruierten, besonders einfach und sicher zu handhabenden Apparatur eine Anzahl biochemisch wichtiger oder als Arzneimittel gebräuchlicher Substanzen tritiummarkiert. Es zeigte sich, daß beim Einwirken von Tritium auf kohleadsorbierte Verbindungen - bis auf wenige Ausnahmen - höhere spezifische Aktivitäten zu erreichen waren als bei den gleichzeitig mitmarkierten Kontrollsubstanzen. Die höheren Markierungsraten können auf die vergrößerten Substanzoberflächen nach Adsorption an aktive Kohle erklärt werden. Arbeitet man bei Temperaturen um  $-200^\circ\text{C}$ , so wird auch das Tritium quantitativ an die Kohle adsorbiert. Die Konzentrierung des radioaktiven Wasserstoffs innerhalb der substanzbeladenen Aktivkohle führte zu einer weiteren Steigerung des Tritiumeinbaues in die zu markierenden Verbindungen.

Die bei dem Wilzbach-Verfahren bisher unter Energiezufuhr von außen möglichen Aktivitätssteigerungen hatten den großen Nachteil, daß gleichzeitig die unerwünschten radioaktiven Nebenprodukte infolge stärkerer Zersetzung der zu markierenden Substanz sich oft beträchtlich vermehrten. Im Gegensatz dazu wurden bei den in dieser Arbeit erfolgreich markierten kohleadsorbierten Präparaten neben höheren spezifischen Aktivitäten geringere Anteile an radioaktiven Nebenprodukten beobachtet.

## A n h a n g :

G. Bedienungshinweise und Arbeitsvorschriften.

## 1.) Bedienung der Markierungsapparatur:

## a) Evakuieren der Apparatur:

Nach Senken des Quecksilbers auf Niveau A (s. Abb. 15) läßt sich über den Ansatz V die gesamte Apparatur evakuieren. Mit einer an das Vorvakuum einer Wasserstrahlpumpe anschließenden Quecksilberdiffusionspumpe erreicht man ein Vakuum von  $10^{-3}$  Torr. Dieser Wert entspricht dem Dampfdruck von Quecksilber bei Zimmertemperatur.

Ein höheres Vakuum läßt sich in dieser Apparatur auch durch Kondensation des Quecksilberdampfes der Hg-Diffusionspumpe mit einer Kühlfalle nicht erreichen. Selbst die kleinsten, beim Bewegen des Quecksilbers der Töplerpumpe in der

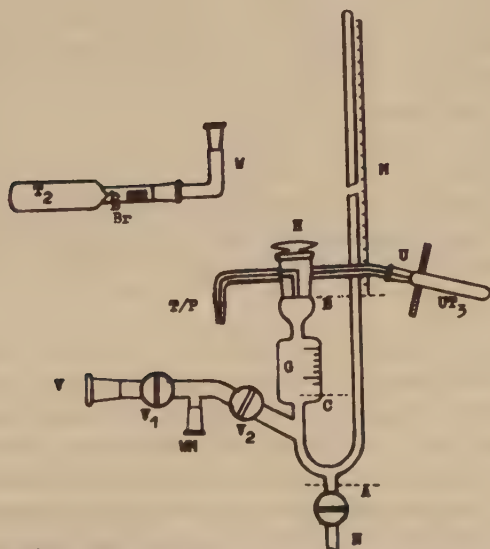


Abbildung 15

Apparatur zur Tritiummarkierung nach dem Wilsbach-Verfahren

H, V<sub>1</sub> und V<sub>2</sub> = Hochvakuumhähne, M = Manometerrohr,  
 G = Gasbürette, U = Röhrchen mit Uranpulver (<sup>238</sup>U),  
 W = Winkelstück, T<sub>2</sub> = Tritiumampulle, Br = Brechsisegel,  
 W<sup>M</sup> = Widerstandsmessometer,  
 T/P = Ansatz für Tritiumampulle und Probengefäße,  
 N = Ansatz zu Quecksilberniveaugefäß,  
 V = Ansatz zur Hochvakuumpumpe.

Apparatur unvermeidlich haftenbleibenden Hg-Kügelchen würden die Wirkung der Kühlfalle wiederaufheben.

Bei frischgefetteten Hähnen und Schliffen dauert das Auspumpen der Apparatur bis zu einem konstanten Endvakuum mehrere Stunden. Hartnäckig an den inneren Glaswänden der Apparatur adsorbierte Wasserdampfreste lassen sich bei laufenden Pumpen unter mehrmaligem Abfächeln mit einer Bunsenbrennerflamme beseitigen.

Zur Kontrolle der Konstanz des erreichten Vakuums wurde ein hinter Hahn  $V_2$  eingeschaltetes Widerstandsmanometer WM verwendet.

#### b) Beschicken mit Tritium:

An Schliff T/P wurde zunächst ein Winkelstück W angesetzt, um die über den Handel bezogene Tritiumampulle ( $T_2$ ) in waagerechter Lage mit der Apparatur zu verbinden. In dieser Stellung ließ sich der Magnet zum Zerschlagen des Brechsiegels Br der Tritiumampulle besser handhaben.

Ansatzrohr zur Tritiumampulle und die gesamte Apparatur wurden zunächst bis zu einem konstanten Endvakuum evakuiert. Nach dem Zerschlagen des Brechsiegels konnte das Tritiumgas durch Senken des Quecksilberstandes von B auf C in die Gasbürette G und von dort aus beim Wiederanheben des Quecksilbers auf B durch den jetzt zum Schliff U geöffneten Hahn H in das dort angeschlossene Vorratsgefäß geleitet werden. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Pumpbewegung läßt sich das Tritium praktisch vollständig in das vorgesehene Vorratsgefäß überführen.

#### c) Tritiumspeicherung als Urantritid:

Gute Aufbewahrungs- und Reinigungsmöglichkeiten für Tritium ergeben sich, wenn man den radioaktiven Wasserstoff unter Bildung eines metallartigen Hydrides an Uran bindet.

Bei Zimmertemperatur kommt es zur Bildung dieses Hydrides nur, wenn man ein besonders aktiviertes Uranpräparat verwendet. Eine brauchbare Aktivierung von Uran durch Zersetzen von Uranhydrid läßt sich gemäß der bei Wacker und Träger beschriebenen Arbeitstechnik erreichen<sup>(64)</sup>.

#### Herstellung des Uranhydrids:

In n-Salzsäure aufgeschlämmtes, anschließend mit Wasser chloridfrei gewaschenes und getrocknetes Uranpulver wurde in

Teilmengen von 250 mg in mehreren Röhrchen aus Duranglas eingefüllt. Diese etwa 5 cm langen Röhrchen waren an einem Ende zugeschmolzen und trugen am anderen Ende die Hülse des Verbindungsschliffes (NS 5/20) zur Apparatur.

Zur Bildung von  $\text{UH}_3$  wurden die Röhrchen mit dem Uranpulver bei  $150^\circ\text{C}$  und 100 Atü Wasserstoffdruck eine Stunde im Autoklaven hydriert<sup>x)</sup>. Unter Stickstoffspülung mußten die Röhrchen mit dem stark pyrophoren Uranhydrid durch passende Schliffkerne verschlossen werden. Ein Röhrchen wurde unter strömenden Stickstoff an dem Schliffkern U der Apparatur befestigt, die anderen in einem gut abgedichteten Vorratsbehälter unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre aufbewahrt.

#### Aktivierung des Urans:

Zur Tritiumaufnahme mußte das in dem Röhrchen U befindliche Uranhydrid bei Temperaturen über  $400^\circ\text{C}$  quantitativ in freies Uran und Wasserstoff zersetzt werden. Die dazu erforderliche Wärme lieferte ein über das Uranröhrchen geschobener elektrischer Widerstandsofen. Um eine übermäßige thermische Belastung der Schliffverbindung zu vermeiden, wurde vor Schliff U eine Asbestscheibe von 5 cm Durchmesser aufgesteckt.

Der aus dem Uranhydrid freigesetzte Wasserstoff wurde mit der Quecksiberdiffusionspumpe solange abgesaugt, bis ein Endvakuum von  $10^{-3}$  Torr erreicht war.

Der aktive Zustand des Urans konnte dadurch überprüft werden, daß eine Teilmenge des freigesetzten Wasserstoffs nach Abkühlen des Urans auf Zimmertemperatur wieder quantitativ gebunden wurde.

Erfahrungen zeigten, daß bei der von Wacker und Träger<sup>(64)</sup> angegebenen Temperatur von  $425^\circ\text{C}$  das Uranhydrid noch nicht vollständig zerfallen war. Höhere Temperaturen ließen noch weitere  $\text{H}_2$ -Anteile frei werden. Zur quantitativen Zersetzung wurde das Uranhydridpulver deshalb unter ständigem Abpumpen des freiwerdenden Gases bis auf  $600^\circ\text{C}$  erhitzt. Ein Verdünnen des später zu bindenden Tritiums durch  $\text{H}_2$ -Reste wurde dadurch vermieden. Bei dieser Temperatur war ein Zusammen-

---

<sup>x)</sup> Herrn Dr. P.E. Schulze von der Schering AG Berlin wird für seine Unterstützung bei der Herstellung des Uranhydrids gedankt.

sintern des aus dem schwarzen Uranhydrid entstehenden braunen Uranmetallschwammes noch nicht zu beobachten. Ebenso verminderte sich dadurch nicht die Fähigkeit, Wasserstoff oder Tritium bei Zimmertemperatur quantitativ zu binden.

#### Adsorption und Desorption des Tritiums:

Frisch hergestelltes, durch Zersetzen von Uranhydrid aktiviertes Uranpulver nahm Tritium, das über die Gasbürette G in das Uranröhrchen geleitet wurde, bei Zimmertemperatur vollständig auf. Der Tritiumdruck in der Apparatur sank dabei unter  $10^{-2}$  Torr.

Eine später nach zahlreichen Tritiumdesorptionen beobachtete Blockierung der Tritiumaufnahme bei Zimmertemperatur wird auf eine Vergiftung des oberflächenaktiven Uranpulvers durch Quecksilber zurückgeführt. Der Quecksilberdampf des in der Hg-Diffusionspumpe und in der Töplerpumpe verwendeten Quecksilbers reicht offenbar aus, das Uranpulver nach einiger Zeit durch Amalgambildung auf der Oberfläche zu inaktivieren. Durch kurzes Erhitzen auf  $100 - 150^{\circ}\text{C}$  konnte bei dem Unterdruck in der Apparatur diese Amalgamschicht wieder zersetzt werden. Tritium wurde dann auch bei Zimmertemperatur wieder quantitativ aufgenommen<sup>x)</sup>.

Zur Desorption des Tritiums wurde das Urantritid auf  $425^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Das freigesetzte Tritium strömte über Hahn H in die etwa bis zur halben Höhe mit Quecksilber gefüllte Gasbürette G. Das dabei bewirkte weitere Absinken des Quecksilberstandes entsprach dem Druckanstieg in der Gasbürette. Die Änderung des Tritiumdruckes ließ sich am Manometerschenkel M verfolgen, ebenso auch das Ende der Gasentwicklung nach etwa 10 Minuten dauerndem Beheizen des Uranspeichers auf  $425^{\circ}\text{C}$ .

Das zunächst in der Gasbürette G gesammelte Tritium wurde nach Schließen der Verbindung zum Uranröhrchen und Öffnen der Bohrung des Hahnes H zum Probengefäß unter Anheben des Quecksilbers auf Niveau B in den Probenbehälter

---

x) Ein durch unvorsichtige Handhabung der Töplerpumpe in das Uranröhrchen gelangtes Quecksilberkügelchen inaktivierte das Uran völlig. Nach vorsichtigem Abdestillieren des Quecksilbers aus dem Uranröhrchen bei  $150^{\circ}\text{C}$  ließ sich das Uran wieder zur Tritiumabsorption verwenden. Inaktivierungserscheinungen durch Quecksilber wurden auch bei anderen wasserstoffaufnehmenden Metallen, z.B. Palladium, beobachtet.

gedrückt.

Schnelle Tritiumentwicklung aus Urantritid bei plötzlichem Erhitzen mit dem auf  $425^{\circ}\text{C}$  vorgeheizten Widerstandsofen hatte zuweilen ein Aufstäuben des Uranpulvers zur Folge. Dabei können Anteile des feinen Pulvers in die gesamte Apparatur einschließlich Probenbehälter gelangen und dort das aus dem Vorratsgefäß freigesetzte Tritium wieder binden (10 mg Uran binden 1,4 ml Tritium; 1 Curie Tritium = 0,38 ml). Eine Schrägstellung des Uranröhrchens nach unten (s. Abb. 15) verhindert die unerwünschte Ausbreitung des Uranpulvers nicht ausreichend. Gut bewährt hat sich bei diesen Arbeiten ein gasdurchlässiger Verschuß aus Asbestwolle kurz vor dem Schliff U des Uranbehälters.

Das zur Herstellung des Uranröhrchens empfohlene Quarzglas wurde, wie schon erwähnt, nicht verwendet. Quarz soll für  $\text{H}_2$  und analog  $\text{T}_2$  bei der Zersetzungstemperatur des Uranhydrids ( $425 - 600^{\circ}\text{C}$ ) schon geringfügig durchlässig sein<sup>97)</sup>. Das Uranröhrchen wurde wie die ganze Apparatur aus Duranglas 50 gefertigt.

#### d) Messung des Tritiumdruckes :

Der Tritiumdruck im Probengefäß ergab sich nach Anheben des Quecksilbers auf Niveau B als Bezugspunkt aus der über B im Manometerschenkel M abmessbaren Quecksilbersäule in mm.

Nach Ablesen des Druckwertes wurde der zum Probengefäß geöffnete Hahn H geschlossen und das Quecksilber bis zum Niveau C gesenkt. Das in G entstehende Vakuum sicherte das Hahnkücken von H in seiner Hülse. Erst zur Wiederholung der Druckmessung wurde der Quecksilberstand nach dem Öffnen des Hahnes zum Probengefäß wieder bis B angehoben.

## 2.) Herstellung der Kohleadsorbate:

Die Beladungshöhe von Adsorbentien ist bei Substanzaufnahme aus Lösungen neben anderen Faktoren abhängig von der Temperatur und Konzentration. Je tiefer die Temperatur desto größere Substanzmengen werden adsorbiert.

Die in den Kapillargängen von Aktivkohle enthaltenen Gase lassen sich durch Wärmeeinwirkung entfernen. Ein kurzes Erwärmen der Kohlesuspensionen wirkt sich deshalb günstig auf eine schnellere Einstellung des Adsorptionsgleichgewichtes aus.

Aus diesem Grunde wurden die Lösungen hitzebeständiger Substanzen mit der Kohle zunächst bis zum Siedepunkt des Lösungsmittels erhitzt und anschließend bis zum Erkalten auf Zimmertemperatur geschüttelt.

Die Kohleadsorbate wurden auf einem Glasfaserfilter von der Lösung getrennt, mit wenig Lösungsmittel nachgewaschen und anschließend im Trockenschrank bei den für die Substanzen jeweils zuträglichen Temperaturen ( $40 - 70^{\circ}\text{C}$ ) vorgetrocknet. Zur Entfernung von Lösungsmittelresten und zur Aufbewahrung kamen die Kohlepräparate in Vakuumexsikkatoren mit Kieselgel oder  $\text{P}_2\text{O}_5$  als Trocknungsmittel.

Beim  $\beta$ -Carotin war wegen der Licht- und Sauerstoffempfindlichkeit eine besondere Behandlung erforderlich. Soweit beim Verarbeiten nicht Lösungsmitteldämpfe die Einwirkung von Luftsauerstoff abschirmten, wurden hier alle Arbeiten unter strömendem Stickstoff ausgeführt. Erhitzen der Carotinslösung vor der Adsorption unterblieb, ebenso ein Vortrocknen im Trockenschrank. Dunkelbraune Glasgefäße schützten vor der Einwirkung von Tageslicht.

### 3.) Aktivitätsmessungen und Eichung der Meßanordnung:

Die schwache  $\beta$ -Strahlung des Tritiums wird schon von Substanzschichten ab  $0,6 \text{ mg/cm}^2$  vollständig absorbiert. Durch Selbstabsorption in der Präparateschicht vermindert sich der von einem fensterlosen Methandurchflußzähler auch bei dünneren Schichten erfaßbare Strahlungsanteil beträchtlich. Um Zählausbeuten von ca. 40 % zu erzielen, ist es deshalb notwendig, von extrem dünnen Präparateschichten auszugehen.

Das folgende Kurvenbild (Abb. 16) zeigt, wie bei Schichtdicken von  $0,1 - 100 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$  die prozentuale Zähl- ausbeute abnimmt. Die Meßwerte wurden mit dem zur Eichung des Gerätefaktors benutzten tritiummarkierten Sulfonamid Rastinon (N-(4-Methylbenzolsulfonyl)-N-Butylharnstoff) erhalten. Die Aktivität dieses Präparates ( $0,26 \text{ uC/mg}$ ) war vorher durch Messung im Gaszählrohr nach Simon<sup>17,18)</sup> mit einer Genauigkeit von  $\pm 4 \%$  ermittelt worden.

Nach dem Verlauf der Kurve in Abbildung 16 liegen die Zähl- ausbeuten bis zu einer Schichtdicke von  $5 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$  in



Abbildung 16, Prozentuale Zählausbeuten von tritiummarkiertem Rastinon ( $0,26 \mu\text{C}/\text{mg}$ ) bei Präparate-Schichtdicken von  $0,1 - 100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , gemessen im Methandurchflußzähler FH 407.

einem befriedigend konstanten Bereich. Bei den Aktivitätsmessungen dieser Arbeit wurden sicherheitshalber Schichtdicken unter  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  angewandt. Der durchschnittliche Wirkungsgrad der Meßanordnung lag hier bei  $43,5 \%$ .

Die zur Messung verwendeten Zählschälchen hatten einen inneren Durchmesser von  $29 \text{ mm}$  und somit einen Flächeninhalt von  $7 \text{ cm}^2$ . Die Substanzproben wurden in Mengen von  $1 - 3 \text{ mg}$  in kleine Reagensgläser eingewogen und jeweils soviel Methanol zugesetzt, daß  $0,025$ -prozentige Lösungen entstanden. Die hier markierten Verbindungen waren alle in dieser Konzentration in reinem Methanol löslich.

Je  $0,02 \text{ ml}$  dieser Lösungen wurden mit einer Blutzuckerpipette in die Zählschälchen gegeben und verteilten sich dort gleichmäßig über die gesamte Bodenfläche. Auf dem Gehäuse des Zählgerätes (FH 49), das während des Betriebes eine Temperatur von  $35 - 45^\circ\text{C}$  annahm, dunstete das Lösungsmittel aus den Präparateschälchen innerhalb weniger Minuten vollständig ab.

Das verwendete Methanol war vorher auf rückstandslose Verflüchtigung geprüft worden.  $100 \text{ ml}$  Methylalkohol hinterließen nach dem Eindampfen in einer Platinschale keinen

wägbaren Rückstand; somit war eine ungewollte Verstärkung der Präparateschicht durch nichtflüchtige Methanolverunreinigungen ausgeschlossen.

Werden Aktivitätsmessungen an markierten Substanzen, die vom labilen Tritium noch nicht befreit sind, vorgenommen, so kommt es bei fensterlosen Methandurchflußzählern leicht zu einer radioaktiven Verseuchung des Zählrohres. Spuren von Wasserdampf genügen, um mit dem Zählgas labiles Tritium aus dem Meßpräparat "auszuwaschen" und in das wirksame Zählrohrvolumen zu verschleppen. Aus diesem Grunde wurde auf die Messung von Substanzen, die noch das bei der Markierung nach Wilzbach mitausgetauschte labile Tritium enthielten, verzichtet.

# H. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s :

- 1) Wilzbach, K.E., J.Amer.chem.Soc. 79, 1013 (1957)
- 2) v.Holt,C., Nolte,J. u. v.Holt,L., Second U.N. intern. Conf. of the peaceful uses of Atomic Energie 15, 979 (1958)
- 3) v.Holt,C., Voelker,J. u. v.Holt,L., Biochim. biophysica Acta Amsterdam 38, 88 (1960)
- 4) Pany, J., Naturwissenschaften 46, 515 (1959)
- 5) Wacker,A., Kirschfeld,S. u. Träger,L., J.Mol.Biol. 2, 24(1960)
- 6) Lemmon,R.M., Tolbert,B.M., Strohmeier,W. u. Whitmore,I.M., Science 129, 1740 (1959)
- 7) Ghanem,N.A., Westermark,T., IAEA.Proc.conference of the use of Radioisotopes, Kopenhagen 1960
- 8) Ache,H.J., Herr,W. u. Thiemann,A., IAEA, Tritium Symposium TTS/10, Wien (1961)
- 9) Westermark,T., Lindroth,H. und Enander,B., Internat. J. appl. Radiat. Isotopes 7, 331 (1960)
- 10) Rosenblum,C., Meriwether,T., Proc.Symposium on Advances in Tracer Applications of Tritium, New York 1958
- 11) Scharpenseel,H.W., Angew.Chem. 71, 640 (1959)
- 12) Hofmann,U., Ragors,A., Rudorff,Gerda, Holst,R., Ruston,W., Ruess,A. und Ruess,G., Z.anorg.allg.Chem. 255, 195 (1947)
- 13) Peters,K. und Lohmar,W., Z. physik. Chem. 180 A, 51 (1937)
- 14) Taylor,H.S., Gould,A.J. und Bleakney,W., Physic.Rev. 43, 496 (1933)
- 15) Dose,H. und Rajewsky,B., Biochem.Z. 330, 131 (1958)
- 16) Fletcher,G.und Okada,S., Radiat.Res. 11, 291 (1959)
- 17) Simon,H., Daniel,H. und Klebe,K., Angew.Chem. 71, 303 (1959)
- 18) Christmann,D.R., Nucleonics 19, 51 (1961)
- 19) Tolbert,B.M., Proc.Symposium on Advances in Tracer Applications of Tritium, New York 1958
- 20) Guinn,V.P. und Wagner,D.D., Atomlight Nr.12, New England Nuclear Corp.
- 21) Funt,B.C., Canad.J.Chem. 39, 711 (1961)
- 22) Scharpenseel,H.W., Angew.Chem. 73, 615 (1961)
- 23) Scharpenseel,H.W., Atompraxis 7, 178 (1961)
- 24) Scharpenseel,H.W., Landwirtsch.Forsch. 14, 42 (1961) (1960)
- 25) Scharpenseel,H.W., Z.Pflanzenernähr., Düng. Bodenkunde 91,132
- 26) Scharpenseel,H.W. u. Menke,K.H., Z.analyt.Chem. 180,1,81(1961)
- 27) Scharpenseel,H.W. u. Menke,K.H., IAEA Tritium Symposium TTS/63 Wien 1961
- 28) Wilzbach,K.E., Kaplan,L. u. Brown,W.G., Science 118, 522(1953)
- 29) Hasan,J., IAEA Tritium Symposium TTS/47 , Wien 1961
- 30) Isbell,H.S. u. Moyer,J., J.Res.Nat.Bur.Standards 63 A,177(1959)

- 31) Rydberg, J., Acta chem.scand. 12, 399 (1958)
- 32) Wenzel, M., Atompraxis 7, 86 (1961)
- 33) Schulze, P.E. u. Wenzel, M., Angew.Chem. 75 (1963)
- 34) Bergström, S. u. Lindstedt, S., Acta chem.scand. 11, 1275 (1957)
- 35) Glascock, R.F. u. Reinas, L.R., Biochem.J. 75, 328 (1960)
- 36) Frantz, jr., I.D., Davidson, A.G., Dalit, E. u. Tait, S.A.S., J. biol. Chemistry 234, 2290 (1959)
- 37) Ayres, P.J., Pearlmann, W.H., Tait, J.F. u. Tait, S.A.S., Biochem.J. 70, 230 (1958)
- 38) Glascock, R.F. u. Hoekstra, W.G., Biochem.J. 72, 673 (1959)
- 39) Pearlmann, W.H., Biochem.J. 66, 17 (1957)
- 40) Pearlmann, W.H. u. O'Donnel, V.C., Biochem.J. 69, 38p (1958)
- 41) Gut, M. u. Uskokovic, M., Naturwissenschaften 47, 40 (1960)
- 42) Gold, V., Lambert, R.W. u. Satchell, D.P.N., Chem. and Ind. 42, 1312 (1959)
- 43) Gold, V., Lambert, R.W. u. Satchell, D.P.N., J.chem.Soc. (London) 2461 (1960)
- 44) Shatenshtein, A.I., Nucl.Sci.Abstr. 14, 13681 (1960)
- 45) Olson, S., Ark. Kemi 14, 85 (1959)
- 46) Clements, G.R. u. Hill, W.T., Science (Washington) 125, 603 (1957)
- 47) Graul, E.H. u. Hundeshagen, H., Atompraxis 5, 154 (1959) (1952)
- 48) Fukushima, D.K. u. Gallagher, T.F., J.biol.Chemistry 198, 861, 871
- 49) Fukushima, D.K., Kritchewsky, T.H., Eidinoff, M.L. und Gallagher, T.F., J.Amer.chem.Soc. 74, 487 (1952)
- 50) Corey, E.J. und Gregorion, G.A., J.Amer.chem.Soc. 81, 3127 (1959)
- 51) Samuelson, B., J.biol.Chemistry 235, 361 (1960)
- 52) Werblin, H., Chaikoff, I.L. u. Jones, E.E., J.biol.Chemistry 234, 282 (1959)
- 53) Hughes, W.L., 2. UN Int.Conf. on the peaceful Uses of Atomic Energy, Genf 1958, Bd.25, S. 203 (1957)
- 54) Verly, W.G. und Hunnebell, G., Bull.Soc.chim.Belgique 66, 640
- 55) Eidinoff, M.L., Cleony, L. u. Rich, M.A., Science (Washington) 129, 1550 (1959)
- 56) Kritchewsky, D., McCandless, R.F.J., Knoll, J.E. und Eidinoff, M.L., J.Amer.chem.Soc. 77, 6655 (1955)
- 57) Schildknecht, H. u. Schlegelmilch, F., IAEA Conference on the Use of Radioisotopes, Kopenhagen 1960
- 58) Fong, C.T.O., Schwartz, J.L., Ppoenoe, E.A., Silver, L. und Schoessler, M.A., J.Amer.chem.Soc. 81, 2592 (1959)
- 59) Bosenfreund, E., Rosenkranz, H.S. u. Bendich, A., J.mol.Biol. 1, 195 (1959)
- 60) Riess, P. und Wilzbach, K.E., J.physik.Chem. 62, 6 (1958)
- 61) Ghanem, N.A. u. Westermarck, T., J.Amer.chem.Soc. 82, 4432 (1960)

- 62) Wilzbach, K.E., Proc. of the Symposium on Tritium in Tracer Applications, New York City, Nov. 1957
- 63) Scharpenseel, H.W., Angew.Chem. 71, 640 (1959)
- 64) Wacker, A. und Träger, L., Angew.Chem. 72, 168 (1960)
- 65) Rydberg, J. und Hanngren, A., Acta chem.scand. 12, 332 (1958)
- 66) Lindström, G.B., Acta chem.scand. 13, 848 (1959)
- 67) Cacace, F., Guasino, A., Montefinale, G. und Possagno, E., Internat.J.appl.Radiat.Isotopes 8, 82 (1960)
- 68) Glascock, R.F. und Pope, G.S., Biochem.J. 75, 328 (1960)
- 69) Andre, T., Acta Radiologica, Suppl. 142, (1956)
- 70) DGM 1 821 049
- 71) Gmelins Hdb. anorg. Chemie 55, 82 Auflage 1935
- 72) Wenzel, M. und Schulze, P.E., Tritium-Markierung, Walter de Gruyter & Co. 1962
- 73) Wilzbach, K.E. u. Dorfman, L.M., IAEA Conference on the Use of Radioisotopes in the Physical Science a. Industry, Kopenhagen 1960
- 74) Ache, H.J., Herr, W. u. Thiemann, A., IAEA Tritium Symposium TTS/10, Wien 1961
- 75) Riess, P. und Wilzbach, K.E., Abstr. of Papers 134<sup>th</sup> Meeting 37 p (1958) ACS
- 76) Bailleul, G., Bratzler, K., Herbert, W., Vollmer, W., Aktive Kohle und ihre industrielle Verwendung, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1953
- 77) Patzsch, H., Pharmaz.Zhalle Deutschland 75, 98 (1934)
- 78) König, J. und Grossfeld, J., Z.Unters.Lebensmittel 27, 508 (1914)
- 79) Gerony, V., Pharmaz.Zhalle Deutschland 83, 493 (1942)
- 80) Koesis, E.A. und Kovacs, Z. analyt. Ch. 124, 40 (1942)
- 81) Barbier, M., Jäger, H., Tobias, H. u. Wyss, E., Helv. chim. Acta 42, 2440 (1959)
- 82) Kirby-Berry, H., Sutton, H.E., Cain, L. u. Berry, J.S., Univers.Texas Puls. 8104, 22 (1951)
- 83) Hübner, G. und Pfeil, E., Z.physiol.Chem. 296, 225 (1954)
- 84) Cavallini, D. u. Frontali, N., Biochim.biophys.Acta 13, 439 (1954)
- 85) Nordmann, J., du Ruisseau, J.P. u. Nordmann, R., Anal.Chem. 67, 668 (1955)
- 86) Cuthbertson, W.F.J. u. Ireland, D.M., Biochem.J. 55, 669 (1953)
- 87) Pietschmann, E., unveröffentlicht
- 88) Steward, F.C., Zacharias, R.M. u. Pollard, I.K., Smomalaisen Tiedeakatemia Toimituksia A II 60, 322 (1955)
- 89) Wagner, G., Arch.Pharm. 286, 269 (1953)
- 90) Geissmann, T.A., Moderne Methoden der Pflanzenanalyse III, Springer Verlag Berlin 1955, S.450
- 91) Roland, I.F. u. Gross, A.M., Anal.Chem. 26, 502 (1954)



## L e b e n s l a u f .

Ich, Hans Wollenberg, wurde am 5. Oktober 1927 in Landsberg an der Warthe als Sohn des Lehrers Georg Wollenberg und seiner Ehefrau Elisabeth geboren.

Nach vierjähriger Grundschulzeit besuchte ich ab April 1938 die Oberschule in Berlin-Hermsdorf. Die durch Kriegsdienst und Kriegsgefangenenschaft unterbrochene Schulausbildung beendete ich am 3. Juni 1947 mit der Reifeprüfung.

Meine Berufsausbildung als Apotheker begann ich mit der zweijährigen Praktikantenzeit, die ich am 21.3.1950 mit der Pharmazeutischen Vorprüfung abschloß. 1951 wurde ich zum Chemiestudium - Fachrichtung Pharmazie - an der Technischen Universität Berlin zugelassen. Am 27.10.1954 bestand ich am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin das Pharmazeutische Staatsexamen und erhielt nach Ableistung der einjährigen Kandidatenzeit zum 15.11.1955 meine Approbation als Apotheker.

Am 28. Mai 1955 heiratete ich die Apothekerin Ingetraud Niesar.

Zur weiteren Ausbildung als Lebensmittelchemiker trat ich am 1.4.1956 in die Landesanstalt für Lebensmittel-, Arzneimittel- und gerichtliche Chemie Berlin als Studienpraktikant ein. Gleichzeitig nahm ich an der Technischen Universität Berlin wieder das Studium der Chemie - Fachrichtung Lebensmittelchemie - auf. Am 3.7.1957 legte ich die Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker vor dem Prüfungsausschuß in Berlin ab.

Zum 1.9.1957 wurde ich als Lebensmittelchemiker in der Landesanstalt eingestellt und hier in allen Abteilungen mit der Untersuchung und Begutachtung von Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen, Arzneimitteln und toxikologischem Probenmaterial beschäftigt. Außerdem richtete ich ein Isotopenlabor zur Messung der Radioaktivität an Lebensmitteln und Wasserproben ein.

Am 1. Mai 1960 wurde ich zunächst zum Chemieassessor, ab 17.10.1960 zum Chemierat ernannt. Anfang Juni 1963 übernahm ich die Leitung einer Abteilung und wurde mit Wirkung vom 28.1.1964 zum Oberchemierat befördert. Mit der Neubesetzung des Leiters der Landesanstalt für Lebensmittel-, Arzneimittel- und gerichtliche Chemie durch Herrn Chemiedirektor Dr. Henning bestellte man mich ab 15.10.1965 zum stellvertretenden Leiter.

Am 29.3.1965 wurde ich Vater eines Sohnes.

Meine Doktorarbeit habe ich neben meiner Tätigkeit in der Landesanstalt im Isotopenlabor des Physiologisch-Chemischen Institutes der Freien Universität angefertigt.





